

**DIE STRICTOSIDIN-SYNTHASE
AUS CATHARANTHUS ROSEUS ZELLKULTUREN:
REINIGUNG, IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
UND IMMOBILISIERUNG EINES ENZYMS
AUS DEM SEKUNDÄRSTOFFWECHSEL**

URSULA PFITZNER

*Diss
Spincken
1984*

DIE STRICTOSIDIN-SYNTHASE AUS CATHARANTHUS ROSEUS
ZELLKULTUREN:
REINIGUNG, IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
UND IMMOBILISIERUNG EINES ENZYMS AUS DEM
SEKUNDÄRSTOFFWECHSEL

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Ursula Pfitzner
aus
Bochum

Juni 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M.H. Zenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 25.7.1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Pflanzliches Material	8
1.1. Differenzierte Pflanzen	8
1.2. Pflanzliche Zellkulturen	8
2. Chemikalien	10
3. Geräte	12
4. Extraktion von Secologanin	12
5. Enzymtests	14
5.1. Bestimmung der Strictosidin-Synthase-Aktivität	14
5.2. Chromatographische Analyse der Strictosidinbildung	16
5.3. Strictosidin-spezifische β -Glukosidasen	17
5.4. Unspezifische β -Glukosidasen	18
5.5. Alkalische Phosphatase	18
6. Proteinbestimmung	19
7. Auftrennung von Zellorganellen durch Dichtegradientenzentrifugation	19
8. Herstellung eines zellfreien Proteinrohextraktes	20
8.1. Differenzierte Pflanzen als Ausgangsmaterial	20
8.2. Zellsuspensionsgewebe als Ausgangsmaterial	21
9. Säulenchromatographische Methoden	21
9.1. Gelfiltration an ACA 44	21
9.2. Hydrophobe Chromatographie an Matrex Gel Red A und Matrex Gel Blue A	22
9.3. Chromatofokussierung an PBE 94 ...	24
9.4. Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose DE 52	25

	Seite
10. Elektrophoresen in Polyacrylamid-	
gelen	25
10.1. Disk-Polyacrylamidgelelektro-	
phorese	26
10.2. SDS-Disk-Polyacrylamidgel-	
elektrophorese	27
10.3. Färbelösungen	28
11. Molekulargewichtsbestimmungen	29
11.1. Gelfiltration an Sephadex G-100 ..	30
11.2. SDS-Gelelektrophorese	30
12. Isoelektrische Fokussierung	31
13. Erzeugung von Antikörpern gegen	
die Strictosidin-Synthase	32
14. Immunologische Methoden	33
14.1. Bestimmung des Antikörpertiters ..	34
14.2. Isolation der Immunglobulin-	
fraktion aus Kaninchenserum	34
14.3. Reaktionen zum Nachweis spezifi-	
scher Antigene und Antikörper	
in Agarosegelen	35
14.3.1. Doppeldiffusion	36
14.3.2. Immunelektrophorese	36
14.3.3. Zweidimensionale	
Immunelektrophorese	37
14.3.4. "Rocket"-Immunelektro-	
phorese	38
14.4. Kopplung von Meerrettichperoxi-	
dase an Immunglobuline	39
15. Immobilisation an CNBr-aktivierten	
Trägern	41
16. Dünnschichtchromatographie	42
17. Spektroskopische Methoden	43

	Seite
III. E R G E B N I S S E	44
1. Reinigung der Strictosidin-Synthase	44
1.1. Gewebeaufschluß	45
1.2. Gelfiltration	45
1.3. Hydrophobe Chromatographie an Matrex Gel Red A	45
1.4. Chromatofokussierung	47
1.5. Semi-präparative Polyacryl- amidgelelektrophorese	49
1.6. Kontrollversuche zur Enzym- reinigung	51
2. Charakterisierung multipler Formen der Strictosidin-Synthase	54
2.1. pH-Optimum	54
2.2. Thermische Inaktivierung	57
2.3. Einfluß der Substratkonzen- tration	59
2.4. Substratspezifität	62
2.5. Molekulargewichtsbestimmung	65
2.6. Hemmstoffversuche zum Enzym- mechanismus	66
3. Antikörper gegen die Strictosidin- Synthase	71
3.1. Antikörper gegen partiell gerei- nigte Strictosidin-Synthase- Enzyme	71
3.1.1. Reinigung der Stricto- sidin-Synthase	72
3.1.2. Charakterisierung des Antiserums	75
3.1.3. Reinigung des Antiserums durch Affinitätschroma- tographie	77

	Seite
3.2. Charakterisierung von Anti- körpern gegen homogene Stric- tosidin-Synthase	84
4. Anwendung spezifischer Antikörper zur Isolation und Charakterisierung der Strictosidin-Synthase aus Zellkulturen und Pflanzen	88
4.1. Immunadsorptionschromatographie der Strictosidin-Synthase aus <u>C. roseus</u> Zellkulturen	88
4.2. Isolation der Strictosidin-Syn- thase aus <u>C. roseus</u> Pflanzen	96
4.3. Untersuchungen zur Natur der multiplen Strictosidin-Synthase- Formen	98
4.4. Immunologische Kreuzreaktion zu Enzymen verwandter Pflanzen- arten	101
5. Immobilisierung der Strictosidin-Syn- thase zur präparativen Darstellung des Enzymproduktes	105
5.1. Reinigung der Strictosidin- Synthase	105
5.2. Immobilisierung der Strictosidin- Synthase	108
5.3. Charakterisierung der immobili- sierten Strictosidin-Synthase	108
5.4. Präparative Synthese von Stric- tosidin	111
5.5. Charakterisierung des Enzympro- duktes	114
6. Transformation von Strictosidin durch <u>C. roseus</u> Zellkulturen	117

	Seite
IV. DISKUSSION	123
V. ZUSAMMENFASSUNG	138
VI. LITERATURVERZEICHNIS	143

Verwendete Abkürzungen

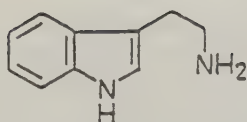
ANS	8-Anilino-1-naphthalinsulfonat
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie ($3.7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $2.22 \times 10^{12} \text{ dpm}$)
CM-	Carboxymethyl-
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
IEF	isoelektrische Fokussierung
kat	Katal (1 Katal entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
MeOH	Methanol
MSH	β -Mercaptoäthanol
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-(Phosphat), reduziert
PB	Polybuffer
PBE	Polybuffer exchanger
PBS	10 mM Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4, 150 mM NaCl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SS	Strictosidin-Synthase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TG	Trockengewicht
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute

I. E I N L E I T U N G

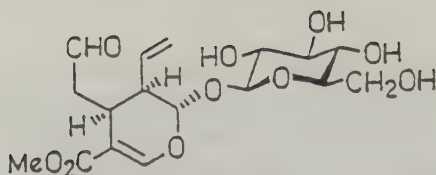
Zu der Klasse der Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs zählen mehr als 1500 unterschiedliche Strukturen, deren Vorkommen sich hauptsächlich auf die Pflanzenfamilien der Apocynaceae (Unterfamilie Plumerioideae), Loganiaceae und Rubiaceae beschränkt. Die volksmedizinische Anwendung einiger alkaloidreicher Arten hat schon früh das Interesse von Pharmazeuten und Phytochemikern geweckt und die Strukturaufklärung dieser Inhaltsstoffe wesentlich gefördert. Besondere Bedeutung in der modernen Medizin haben Ajmalicin und Reserpin zur Therapie von Bluthochdruckkrankheiten und die dimeren Indolalkaloide Vinblastin und Vincristin als Cytostatika bei der Krebsbekämpfung erlangt.

Erste Untersuchungen zur Biogenese der Indolalkaloide wurden von LEETE (1960, 1961) durchgeführt. Fütterung von $[2-^{14}\text{C}]$ Tryptophan ergab einen Einbau der radioaktiven Markierung in Ajmalin, Serpentin und Reserpin. Später zeigten dann KUTNEY et al. (1968) und BATTERSBY et al. (1968 a, 1969 a), daß auch das Decarboxylierungsprodukt, Tryptamin, als Vorstufe dienen kann (Abbildung 1).

Damit war ein Baustein der Indolalkaloide relativ schnell gefunden. Die Herkunft des restlichen C_{9-10} -Gerüstes blieb jedoch lange Spekulationen überlassen. Experimentell bestätigt wurde schließlich die unabhängig von THOMAS (1961) und WENKERT (1962) aufgestellte Hypothese über den Einbau einer Monoterpeneinheit. Die Arbeitsgruppen um BATTERSBY und ARIGONI veröffentlichten die spezifische Inkorporation von radioaktiv markiertem Loganin, einem Geraniolderivat, in Alkaloide unterschiedlicher Grundskelette (BATTERSBY et al., 1966, 1968 b, LOEW und ARIGONI, 1968, BATTERSBY und GIBSON, 1971). Den nächsten Schritt in der Biosynthese



Tryptamin



Secologanin

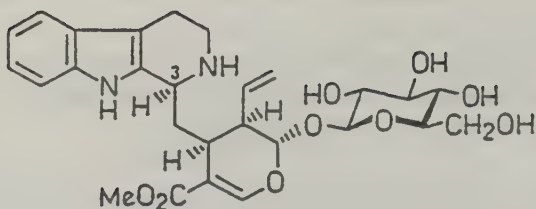
Abb. 1: Tryptamin und Secologanin, Biosynthesevorstufen monoterpenoider Indolalkaloide

stellt dann die Ringöffnung zum Secologanin dar (BATTERSBY et al., 1968 c, 1969 b, INOUE, 1978, Abbildung 1). Die zwei aufgrund von Fütterungsversuchen postulierten Vorstufen legten als erstes und einfachstes Indolalkaloid eine glukosidierte Verbindung nahe, deren Struktur kaum Zweifel zuließ. Verwirrung herrschte jedoch lange Zeit über die Stereochemie am Kohlenstoffatom C-3.

BATTERSBY gelang 1968 die biomimetische Kondensation von Tryptamin und Secologanin in saurem Milieu. Produkte dieser Reaktion waren zwei isomere Verbindungen, Vincosid und Isovincosid, deren natürliches Vorkommen in Vinca rosea, einer alkaloidreichen Pflanze aus der Familie der Apocynaceae, nachgewiesen werden konnte. Fütterungsexperimente ergaben aber eindeutig den Einbau nur eines dieser Isomeren, des Vincosids, in Ajmalicin, Serpentin und andere Alkaloide (BATTERSBY et al., 1968 a, 1969 a). Gleichzeitig veröffentlichte SMITH die Isolation einer Substanz aus Rhazia-Arten, die er Strictosidin nannte und der er eine zentrale Rolle in der Biosynthese monoterpenoider Indolalkaloide zuschrieb (SMITH, 1968, BROWN et al., 1968). Die Konfiguration an C-3 wurde nach Abbau und Vergleich mit einem chemischen Standard als 3 α (S) angegeben, die Identität mit Isovincosid gezeigt (DE SILVA et

al., 1971). BATTERSBY und BROWN konzentrierten ihr Interesse jedoch auch weiterhin ausschließlich auf Vincosid, dessen absolute Konfiguration sie mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse als $3\beta(R)$ bestimmten (KENNARD et al., 1971, BLACKSTOCK et al., 1971).

Jahrelang galt Vincosid als zentrales Intermediat der Indolalkaloidbiosynthese in höheren Pflanzen. Erst die Einführung moderner Zellkulturmethoden (SCOTT und LEE, 1975) führte zu einer Überprüfung dieser Hypothese. ZENK und Mitarbeiter (ZENK et al., 1977) stellten 1977 ein für Heteroyohimbine optimiertes System vor. Ausgehend von alkaloidreichen Individuen einer großen Population von Catharanthus roseus Pflanzen (synonym mit Vinca rosea) wurden mit Hilfe hochempfindlicher Analyseverfahren wie dem Radioimmuntest (ARENS et al., 1978) Zelllinien etabliert, die in vivo eine überdurchschnittliche Naturstoffproduktion aufwiesen. Auch in vitro konnte die Bildung von Ajmalicin, 19-epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin aus Tryptamin und Secologanin in Anwesenheit von NADPH oder NADH gezeigt werden (STÖCKIGT et al., 1976). Durch Variation der Inkubationsbedingungen wurden bald zwei wichtige Intermediate abgefangen. Aus Ansätzen ohne reduzierte Cosubstrate gelang die Isolation einer oxidierten Alkaloidvorstufe, die Cathenamin genannt wurde (STÖCKIGT et al., 1977, STÖCKIGT, 1979). Entscheidend war auch die Beobachtung, daß bei Zusatz von δ -Gluconolacton als Inhibitor für eine vermutete β -Glucosidase-Aktivität eine polare Substanz akkumulierte (TREIMER und ZENK, 1978). Diese erwies sich als das unmittelbare Kondensationsprodukt aus Tryptamin und Secologanin. Die sorgfältige chromatographische und spektroskopische Analyse ergab, daß ausschließlich die Verbindung mit $3\alpha(S)$ -Konfiguration enzymatisch gebildet worden war (STÖCKIGT und ZENK, 1977 a und b, STÖCKIGT, 1979). Fütterungsversuche bestätigten den Umsatz dieses Alkaloids durch Einbau in



3 α (S)-Strictosidin

Abb. 2: Strictosidin, Biosynthesevorstufe monoterpenoider Indolalkaloide

Ajmalicin, Serpentin, Vindolin und Catharanthin (STÖCKIGT und ZENK, 1977 b). Übereinstimmende Ergebnisse wurden daraufhin auch von SCOTT (SCOTT et al., 1977) und BROWN (BROWN et al., 1978) publiziert.

In Anerkennung der Arbeiten von SMITH setzte sich in der Literatur für die Verbindung mit 3 α (S)-Konfiguration der Name Strictosidin an Stelle der früher gebräuchlichen Bezeichnung Isovincosid durch (Abbildung 2). Bekräftigt wurde die herausragende Bedeutung dieser Substanz nicht nur durch Inkorporation in alle bekannten Grundskelette der Indolalkaloide monoterpenoiden Ursprungs, sondern auch durch Einbau in Corynanthe-Typ-Verbindungen mit 3 β (R)-Wasserstoffatom (RÜFFER et al., 1978, NAGAKURA et al., 1979). Das Epimere, Vincosid, erwies sich als biogenetisch völlig inaktiv. Damit wurde gezeigt, daß lediglich Strictosidin mit 3 α (S)-Konfiguration die universelle Vorstufe für die Indolalkaloidbiosynthese höherer Pflanzen ist. Weitere zellfreie Studien resultierten schließlich in der Aufklärung der gesamten Sequenz zu Ajmalicin und seinen Isomeren in Catharanthus roseus ausgehend von Strictosidin (STÖCKIGT, 1980, ZENK, 1980). Ein vereinfachtes Biosyntheschema ist in Abbildung 3 wiederge-

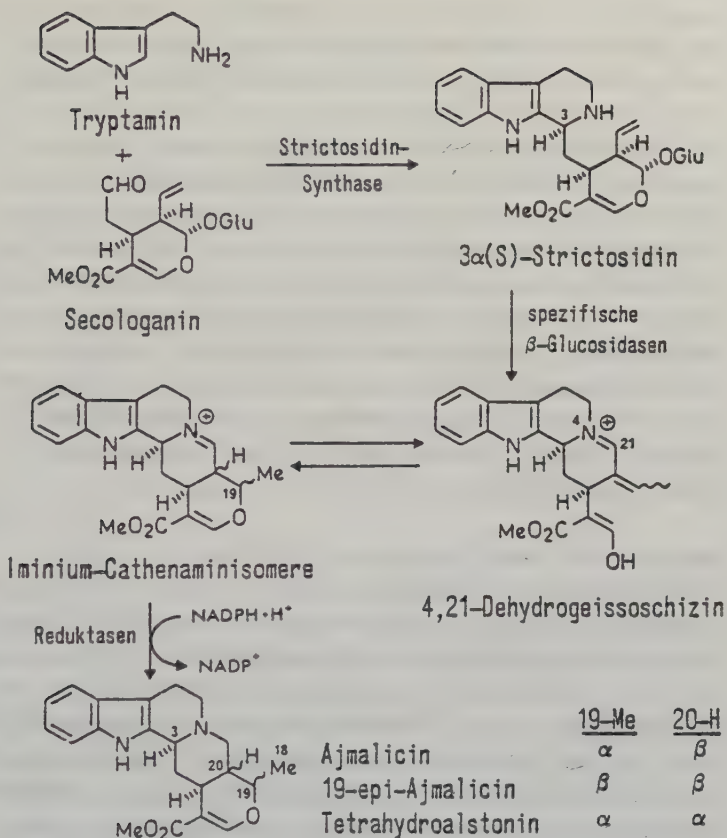


Abb. 3: Vereinfachtes Biosyntheseschema der Heteroyohimbin-Typ-Alkaloide in C. roseus nach ZENK (1982)

geben (ZENK, 1982).

Mit der Charakterisierung von Zwischenprodukten kam auch die Frage nach den an der Heteroyohimbinbiosynthese beteiligten Enzymen auf. Die geschilderten in vitro Experimente legten mindestens zwei Schritte nahe, die hydrolytische Abspaltung der Glukose aus

Strictosidin und die Cosubstratabhängige Reduktion zu den Ajmalicinisomeren (Abbildung 3). Die Aufklärung wurde in den letzten Jahren intensiv vorangetrieben.

Die Arbeitsgruppe um SCOTT verwandte dabei als Ausgangsmaterial auch weiterhin Kalluskulturen, während ZENK und Mitarbeiter von den durch Selektion gezüchteten Hochleistungsstämmen Suspensionskulturen anlegten. Moderne Fermentationstechniken, wie sie für Mikroorganismen schon lange üblich sind, ermöglichten die Massenproduktion von Zellgewebe und schufen somit ideale Voraussetzungen für die Isolation von Sekundärstoffenzymen, die nur in geringen Mengen verglichen mit den Proteinen des Primärstoffwechsels vermutet werden konnten (ZENK et al., 1977).

Bereits 1977 veröffentlichte SCOTT die Reinigung einer "Ajmalicin-Synthetase", die ausgehend von Tryptamin und Secologanin in Anwesenheit von NADPH die Bildung von Heteroyohimbin-Typ-Alkaloiden katalysierte und ein Molekulargewicht von 55 000 Dalton aufwies (SCOTT et al., 1977 a). Gegensätzliche Ergebnisse wurden von ZENK und Mitarbeitern erzielt. 1980 beschrieben sie die partielle Anreicherung und Charakterisierung zweier für Strictosidin spezifischer β -D-Glukosidasen mit Molgewichten von 230 000 und $>450\,000$ Dalton (HEMSCHIEDT und ZENK, 1980). Erste Hinweise auf die Beteiligung mehrerer Reduktasen an der Bildung von Ajmalicin, 19-epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin präsentierte STÖCKIGT (1980). Bestätigt wurde diese Vermutung durch HEMSCHIEDT, der den Nachweis mindestens zweier Oxidoreduktasen erbrachte, von denen eine spezifisch die Synthese von Tetrahydroalstonin katalysierte, während eine andere Enzymaktivität zur Akkumulation von Ajmalicin und 19-epi-Ajmalicin führte (HEMSCHIEDT, 1983).

Im Mittelpunkt des Interesses stand jedoch von Anfang an die proteinabhängige Kondensation von Tryptamin und Secologanin. Für dieses Enzym war zunächst der Name Strictosidin-Synthetase vorgeschlagen worden (STÖCKIGT und ZENK, 1977 b). Später wurde dieser zu Strictosidin-Synthase abgeändert (TREIMER und ZENK, 1979 b), da die Reaktion keine Abhängigkeit vom Zusatz phosphorylierter Nukleotide zeigt. Enzymaktivitäten mit ähnlichen physikochemischen und katalytischen Eigenschaften konnten in mehreren Arten der Apocynaceae nachgewiesen werden (STÖCKIGT und ZENK, 1977 b, TREIMER und ZENK, 1979 a). Das Produkt wurde in jedem Fall als 3 α (S)-Strictosidin identifiziert. Damit muß der Strictosidin-Synthase eine Schlüsselposition in der Biosynthese aller monoterpenoiden Indolalkaloide zugeschrieben werden.

Versuche zur Anreicherung des Enzyms aus Catharanthus roseus wurden gleichzeitig von den beiden Arbeitskreisen um SCOTT und ZENK veröffentlicht (MIZUKAMI et al., 1979, TREIMER und ZENK, 1979 b). Beide Gruppen beschränkten sich jedoch zunächst auf die Dokumentation der katalytischen und einiger physikochemischer Eigenschaften.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolation und Charakterisierung der Strictosidin-Synthase erneut untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung homogener Enzympräparationen, um die Basis für eine weiterführende biochemische Analyse des Proteins zu schaffen. Ein anderes Ziel war die Ausarbeitung einer präparativen Methode zur Darstellung des Enzymproduktes und die Transformation des gewonnenen Strictosidins in abgeleitete Indolalkaloide.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzliches Material

1.1. Differenzierte Pflanzen

Pflanzen von Catharanthus roseus, Nauclea latifolia und Rhazia orientalis wurden im Gewächshaus bei Temperaturen zwischen 20°C und 25°C und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Für die Pflege danke ich Herrn Nagy.

1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Die Isolation der Strictosidin-Synthase erfolgte aus Zellsuspensionskulturen von Catharanthus roseus (L.) G. Don, die auf hohen Alkaloidgehalt hin selektio- niert waren (DEUS, 1980).

Die Kulturen wurden in 1 Liter Erlenmeyerkolben mit je 250 ml LS-Medium (LINSMAIER und SKOOG, 1965) auf Rotationsschüttlern (100 UpM) bei 23°C und Dauerlicht (600 Lux) angezogen. Als Inoculum dienten jeweils 20 ml feuchte Zellmasse der Vorkultur. Nach 7 tägiger Wachstumsdauer (SEIPEL, 1979) wurde das Kulturmedium durch Vakuumfiltration entfernt, das Gewebe mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Abweichende Wuchsbedingungen für alle übrigen Suspensionskulturen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Folgende Medien fanden Verwendung.

LS nach LINSMAIER und SKOOG (1965),

Zellkultur	Medium	Wuchsdauer
<i>Alstonia scholaris</i> (L.) R.Br.	4x	7 Tage
<i>Catharanthus longifolius</i> Pich.	LS	7 Tage
<i>Ervatamia divaricata</i> (R.Br.) Burkill	DAX	7 Tage
<i>Mitragyna speciosa</i> Korth.	LS	7 Tage
<i>Nauclea latifolia</i> Smith	LS	14 Tage
<i>Nicotiana sylvestris</i> Spegazz. et Comes	4x	15 Tage
<i>Ochrosia elliptica</i> Labill.	DAX	7 Tage
<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth.	LS	13 Tage
<i>Stemmadenia tomentosa</i> Greenman	4x	7 Tage
var. <i>palmeri</i>		
<i>Tabernanthe iboga</i> Baill.	4x	21 Tage
<i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.	4x	17 Tage
<i>Vinca herbacea</i> W.K.I.	LS	9 Tage
<i>Voacanga africana</i> Stapf.	4x	23 Tage

Tab. 1: Wuchsbedingungen verwendeter Zellsuspensionskulturen

4x nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert wie
ULBRICH und ZENK (1979),

DAX nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert wie
ZENK et al. (1975).

Für die Anlage von Kalluskulturen und einer Suspensi-
onskultur von C. roseus danke ich Frau Dr. B.Deus-
Neumann.

2. Chemikalien

[2-³H]Tryptaminbisuccinat wurde nach der von TREIMER
(1979) beschriebenen Methode aus Indol-2-Carbonsäure
(Sigma) und ³H₂O (Amersham-Buchler, Braunschweig) syn-
thetisiert. Die Ausbeute betrug 14% bezüglich der ein-
gesetzten Carbonsäure bei einer spezifischen Aktivität
von 5.9 mCi/mMol. Für die Messung der Enzymaktivität
der Strictosidin-Synthase wurde die spezifische Aktivi-
tät durch Zugabe von nicht markiertem Tryptamin auf
0.5 mCi/mMol gesenkt.

[7-³H]Secologanin wurde nach der von NAGAKURA et al.
(1979) beschriebenen Methode synthetisiert. Ich danke
Herrn Dr. T.Hemscheidt für die Überlassung dieser Sub-
stanz.

Herrn L.Andert danke ich für die Synthese von [1'-¹⁴C]-
Tryptamin.

Referenzalkaloide wurden mir freundlicherweise überlas-
sen von Prof. C.R.Hutchinson (Madison, USA),
Dr. N.Neuss (Indianapolis, USA) und Prof. E.Winterfeldt
(Hannover). Die für die Substratspezifität verwandten
Tryptaminderivate stammten von Dr. F.Kaiser, Boehr-
inger (Mannheim).

LKB Produktor AB (Bromma, Schweden) lieferte Ultro-

gel ACA 44 und Ampholine Carrier Ampholyte pH 4.0-6.5.

Polybufferexchanger PBE 94, Polybuffer PB 74, CNBr-aktivierte Sepharose, Sephadex G-100, DEAE Sephadex A-50 und ein Satz Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Gelelektrophorese wurden von Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen.

Von der Firma Serva (Heidelberg) stammten Acrylamid (2 x krist.), Bisacrylamid, TEMED, Rinderserumalbumin, Ammoniumsulfat und Coomassie Brilliant Blue R-250 und G-250.

Riboflavin, SDS, Barbitursäure, Natriumbarbiturat und NaBH_4 waren von Merck (Darmstadt).

CNBr-aktivierte quervernetzte Agarose, aktivierte Holzkohle, 2,4-Pentandion, PMSF, alkalische Phosphatase, p-Nitrophenylphosphat, m-Perjodat, Pararosanilin, Meerrettichperoxidase, 3,3'-Diaminobenzidin und Diäthylpyrocarbonat wurden von Sigma (München) geliefert.

Tryptamin stammte von Fluka (Buchs, Schweiz), Matrex Gel Red A und Matrex Gel Blue A von Amicon (Witten/Ruhr), FREUND's komplettes Adjuvant stammte von Difco, ein Satz Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration von Boehringer (Mannheim) und DEAE-Cellulose DE 52 von Whatman Biochemicals (Springfield Mill, USA).

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel stammten von den üblichen Quellen und waren von größtmöglicher Reinheit.

3. Geräte

Alle Proteinreinigungsschritte wurden an einer Chromatographiestation der Firma LKB (Bromma, Schweden) bestehend aus Multirac, Uvicord S II, Microperplex Peristaltic Pump und Copper Bar Recorder durchgeführt. Für elektrophoretische Methoden stand das Netzgerät 2103 zur Verfügung.

Zentrifugationen wurden in einer gekühlten Sorvall Superspeed Zentrifuge RC-5B mit den Rotoren SS 34 oder GSA der Firma Du Pont Instruments durchgeführt.

Radioaktivitätsmessungen von wässrigen und methanolischen Proben erfolgten in einem Betaszint BF 5004 Szintillationszähler mit jeweils 5 ml Rotiszint 22 der Firma Roth (Karlsruhe). Die Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit einem LB 2722-2 Dünnschichtscanner bestimmt. Beide Geräte stammten von der Firma Berthold (Wildbad).

4. Extraktion von Secologanin

Während Tryptamin, ein einfaches organisches Molekül, zu günstigem Preis käuflich zu erwerben ist, leitet sich das zweite Substrat der Strictosidin-Synthase-Reaktion, Secologanin, selbst aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanzen ab. Das natürliche Vorkommen wurde erstmals von SOUZU und MITSUHASHI (1970) in Lonicera morrowii beschrieben. Weiterführende Studien zeigten eine allgemeine Verbreitung dieses Monoterpens in der Familie der Caprifoliaceae an (KLÜSENER, 1976). Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial stammte von verwildert wachsenden Büschen der Arten Symphoricarpos rivularis und Lonicera tatarica und wurde im Spätsommer (Juli-August) gesammelt. Der Isolationsprozeß wur-

de in der von SLEIGH (pers. Mitteilung) beschriebenen Weise nachvollzogen.

1.5 kg frisch geerntete Blätter wurden im Waring Blendor in Methanol zerkleinert und 2 x 2 Tage unter gelegentlichem Umrühren mit jeweils 4 l Methanol kalt extrahiert. Das Lösungsmittel wurde durch Mull abfiltriert, der Extrakt am Rotationsverdampfer bis zu einem braunen Öl eingengt und in ca. 200 ml H_2O aufgenommen. Durch 4 maliges Ausschütteln mit je 250 ml Petroläther wurde die wässrige Phase entfettet und nach Zugabe von 800 ml gesättigter NaCl-Lösung 5 mal mit je 250 ml Chloroform/Äthanol = 2/1 extrahiert. Die organische Phase wurde eingengt, das zurückbleibende bräunliche Öl in H_2O aufgenommen und 4 mal mit je 200 ml Essigester ausgeschüttelt. Der Essigesterextrakt wurde verworfen und die Secologaninfraktion durch Aussalzen in eine Chloroform/Äthanol-Phase (2/1, 4 x 200 ml) überführt. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wurde das organische Lösungsmittel abgedampft. Zurück blieb ein gelber bis bräunlicher Schaum, der 50%-80% Secologanin enthielt. Die höchste Ausbeute betrug 9.6 g/1.5 kg Blattmaterial.

Für die weitere Reinigung dieses Rohproduktes danken wir Herrn Dr. F.Kaiser (Boehringer, Mannheim) und Herrn Dr. Christ (Nattermann, Köln).

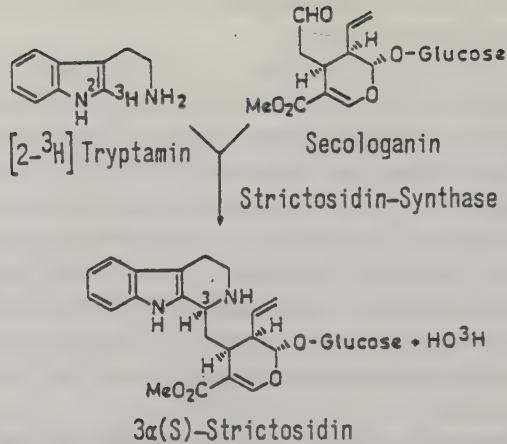


Abb. 4: Prinzip des Enzymtestes auf Strictosidin-Synthase-Aktivität

5. Enzymtests

5.1. Bestimmung der Strictosidin-Synthase-Aktivität

Das Prinzip des für die Quantifizierung der Strictosidin-Synthase verwendeten Enzymtestes beruht auf den von TREIMER und ZENK (1979 b) entwickelten Vorstellungen und ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Die Durchführung erfolgte in der von SEIPEL (1979) beschriebenen Abwandlung.

Bei der enzymkatalysierten Kondensation von spezifisch in 2-Stellung markiertem Tryptamin mit Secologanin wird das Tritiumatom in das umgebende Medium als HO³H abgegeben. Die Umsetzung der Substrate erfolgt dabei streng stöchiometrisch in einem Verhältnis von 1:1 (TREIMER und ZENK, 1979 b). Die Messung der Radioaktivität im wässrigen Überstand nach Adsorption von überschüssigem [2-³H]Tryptamin an Aktivkohle und deren Se-

dimentation stellt daher ein direktes Maß für die Enzymaktivität dar. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Anlagerung von $[2-^3\text{H}]$ Tryptamin an Kohle vollständig ($>99\%$) und die Adsorption von HO^3H vernachlässigbar ($<1\%$) ist (SEIPEL, 1979).

Der Test wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt.

10 μMol Kaliumphosphatpuffer pH 6.5,

1.2 μMol Secologanin und

90 nMol $[2-^3\text{H}]$ Tryptaminbisuccinat (0.5 mCi/nMol)

wurden zusammen mit der Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 0.1 ml bei 37°C inkubiert. Nach 60 minütiger Reaktionszeit wurde der Enzymtest durch Zugabe von 0.3 ml Aktivkohlesuspension (2 g in 50 ml H_2O) abgestoppt, die Reaktionsgefäße 1 Minute lang heftig geschüttelt (Mischer 5432 der Firma Eppendorf, Hamburg) und anschließend 5 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert (Tischzentrifuge 5412 der Firma Eppendorf, Hamburg). Von dem klaren Überstand wurden 0.2 ml in ein Szintillationsgläschen überführt und die Radioaktivität bestimmt.

Als Nullwert dienten Ansätze ohne Enzymlösung oder mit hitzedenaturiertem Protein. Die Bestimmung der Strictosidin-Synthase-Aktivität erfolgte wie beschrieben (TREIMER, 1979). Da die ^3H -Markierung des Tryptamins nicht vollständig in 2-Stellung lokalisiert war, wurde die maximal freisetzbare Radioaktivität nach Inkubation mit einem hohen Enzymüberschuß gemessen und als 100%-Umsatzwert bezogen auf die Gesamtsubstratmenge (90 nMol) der Berechnung zugrunde gelegt.

Ein kat Strictosidin-Synthase entspricht der Enzymmenge, die die Bildung von 1 Mol Strictosidin pro Sekunde bei 37°C und pH 6.5 in Anwesenheit von 0.9 mM Tryptamin und 12 mM Secologanin katalysiert.

5.2. Chromatographische Analyse der Strictosidinbildung

In den Arbeiten von STÖCKIGT und ZENK (STÖCKIGT und ZENK, 1977 a und b, STÖCKIGT, 1979) war das Produkt der enzymkatalysierten Kondensation von Tryptamin und Secologanin schon eindeutig als Strictosidin identifiziert worden. Die chromatographische Dokumentation der Reaktion basiert auf den publizierten Daten.

Die Bildung von Strictosidin durch spezifische Enzyme wurde in Ansätzen gezeigt, die

- 10 μ Mol Kaliumphosphatpuffer pH 6.5,
- 1.2 μ Mol Secologanin,
- 90 nMol Tryptamin,
- 540 nCi [$1'-^{14}\text{C}$]Tryptamin (40 mCi/mMol) und
- 50 pkat Enzym

enthielten und unter Standardbedingungen (II.5.1.) inkubiert wurden. Ein Aliquot aus jedem Ansatz wurde auf Dünnschichtkieselgelfolien (Macherey-Nagel & Co., Düren) aufgetragen und in dem Fließmittel I (Aceton/Methanol /Diäthylamin = 7/1/1) entwickelt. Tryptamin (R_f -Wert 0.78) wird dabei deutlich von Strictosidin (R_f -Wert 0.36) abgetrennt.

Die enzymatische Synthese von [$5-^{14}\text{C}$]Strictosidin erfolgte in Ansätzen ähnlicher Zusammensetzung. Als Enzymquelle wurden Präparationen verwendet, die über Gel-filtration angereinigt worden waren und danach keine Strictosidin-spaltenden β -Glukosidasen mehr enthielten (III.5.1.).

- 10 μ Mol Kaliumphosphatpuffer pH 6.5,
- 1.2 μ Mol Secologanin,
- 6.5 μ Ci [$1'-^{14}\text{C}$]Tryptamin (40 mCi/mMol) und
- 100 pkat Enzym

wurden unter Standardbedingungen (II.5.1.) inkubiert und anschließend der gesamte Ansatz auf einer DC-Folie

im Fließmittelsystem I (Aceton/Methanol/Diäthylamin = 7/1/1) aufgetrennt. Die radioaktive Strictosidinbande wurde mit Methanol eluiert. Die Ausbeute betrug 54% bezogen auf das eingesetzte [$1'-^{14}\text{C}$]Tryptamin.

Die Substratspezifität der Strictosidin-Synthase für den Indolteil wurde in Anwesenheit von

- 1o μMol Kaliumphosphatpuffer pH 6.5,
- 12o nMol [$7-^3\text{H}$]Secologanin (9.6 mCi/mMol),
- 1oo nMol Tryptaminderivat und
- 3o pkat Enzym

bestimmt. Nach 2 - und 6 stündiger Inkubation wurde aus jedem Ansatz ein Aliquot entnommen und in dem Fließmittelsystem II (Chloroform/Methanol = 4/1, R_f -Wert Secologanin 0.51, R_f -Wert Strictosidin 0.27) aufgetrennt.

5.3. Strictosidin-spezifische β -Glukosidasen

Der Test spezifischer β -Glukosidasen basiert auf der unterschiedlichen Wasserlöslichkeit des Substrates Strictosidin und des gebildeten Aglykons. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der Vorschrift von HEMSCHIEDT und ZENK (1980).

Für die Messung danke ich Herrn Dr. T.Hemscheidt.

Ein kat Strictosidin-spezifische β -Glukosidase entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol Strictosidin pro Sekunde bei 30°C und einer Substratkonzentration von $6\ \mu\text{M}$ durch Hydrolyse der glukosidischen Bindung spaltet.

5.4. Unspezifische β -Glukosidasen

Die Bestimmung p-Nitrophenyl- β -D-Glukosid-spaltender Enzyme geht zurück auf die Messungen von SCOTT et al. (1977 a), die mehrere Hydrolasen in einem zellfreien Extrakt aus C. roseus nachweisen konnten und einer dieser Aktivitäten eine Rolle in der Biosynthese der Heteroyohimbin-Typ-Alkaloide zuschrieben.

20 μ Mol Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 und

0.5 μ Mol p-Nitrophenyl- β -D-Glukosid

wurden zusammen mit der Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 0.2 ml inkubiert. Nach 2 - bis 4 stündiger Reaktionszeit bei 30°C wurde der Enzymtest durch Zugabe von 1.0 ml 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt und die Extinktion bei 400 nm gegen einen Blindwert ohne Protein gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte über den molaren Extinktionskoeffizienten für p-Nitrophenol von $18.5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Ein kat β -Glukosidase ist definiert als die Enzymmenge, die 1 Mol p-Nitrophenyl- β -D-Glukosid pro Sekunde bei 30°C, pH 6.5 und einer Substratkonzentration von 2.5 mM hydrolysiert.

5.5. Alkalische Phosphatase

Reaktionen mit alkalischer Phosphatase (Sigma) wurden in Anlehnung an die Angaben des Herstellers durchgeführt.

40 μ Mol Tris/HCl-Puffer pH 9.0,

0.4 μ Mol MgCl_2 ,

0.4 μ Mol ZnCl_2 ,

7.4 μ g Strictosidin-Synthase-Proteine und

46 pkat alkalische Phosphatase (10 μ g Protein)

wurden in einem Gesamtvolumen von 0.4 ml 1 h bzw. 2 h

bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt (II.10.1.).

6. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der von BRADFORD (1976) entwickelten Methode. Lineare Eichgeraden mit Rinderserumalbumin als Standard wurden im Bereich von 0 - 100 µg Protein und im Bereich von 0 - 20 µg Protein mit 5 ml bzw. 1 ml Farbreagenz aufgestellt.

7. Auftrennung von Zellorganellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an BREIDENBACH und BEEVERS (1967).

Aufschlußpuffer:

150 mM Tricin/NaOH-Puffer pH 7.5

500 mM Saccharose

10 mM KCl

1 mM MgCl₂

1 mM EDTA

5 mM Thioglykolat

Gradientenpuffer:

50 mM Tricin/NaOH-Puffer pH 7.5

1 mM EDTA

Alle Schritte wurden bei 0°C - 4°C durchgeführt.

50 g frisch gesammelte C. roseus Blätter wurden mit 40 ml Aufschlußpuffer 15 Minuten lang im Mörser zerrieben. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Mull gepreßt und 10 Minuten bei 750 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und jeweils ca. 5 ml vorsichtig

auf kontinuierlich geschichtete Saccharosegradienten (60% w/w in Gradientenpuffer bis 20% w/w in Gradientenpuffer) pipettiert. Die Auftrennung der Zellorganellen erfolgte 4 h in der Beckman Ultrazentrifuge L-2 im Ausschwingrotor SW 25.2 bei 61 000 x g. 26 Fraktionen zu 2 ml Volumen wurden durch Abpumpen des Gradienten vom Zentrifugenbecherboden her gesammelt. Zur Messung der Strictosidin-Synthase-Aktivität wurde je ein Aliquot in den Standardenzymtest eingesetzt (II.5.1.), die Saccharosekonzentration wurde im Refraktometer 87 993 der Firma Zeiss bestimmt.

8. Herstellung eines zellfreien Proteinrohextraktes

8.1. Differenzierte Pflanzen als Ausgangsmaterial

Die Isolation der Strictosidin-Synthase-Aktivität erfolgte aus Blättern von Catharanthus roseus, Nauclea latifolia und Rhazia orientalis. Alle Schritte wurden bei 0°C - 4°C durchgeführt.

Das pflanzliche Material wurde zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einer Analysenmühle der Firma Jahnke & Kunkel (Staufen) zerkleinert. Zu dem feinen Gewebepulver wurde die doppelte Menge (w/v) Aufschlußpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH) gegeben, 30 Minuten lang gerührt und die Suspension durch 4 Lagen Mull gepreßt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 Minuten, 27 000 x g) entfernt und der Überstand (Proteinrohextrakt) einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation gesammelt (20 Minuten, 27 000 x g), in Aufschlußpuffer aufgenommen.

men und über Nacht dialysiert.

8.2. Zellsuspensionsgewebe als Ausgangsmaterial

Die Extraktion der Strictosidin-Synthase aus Zellkulturen wurde ähnlich der unter II.8.1. beschriebenen Prozedur durchgeführt.

Das eingefrorene Gewebe wurde mit der doppelten Menge (w/v) Aufschlußpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH) versetzt und bis zum vollständigen Auftauen gerührt. Diese Suspension wurde durch 4 Lagen Mull gepreßt und der nach Zentrifugation (20 Minuten, 27 000 x g) gewonnene Rohextrakt durch eine Ammoniumsulfatfällung konzentriert. Präzipitierte Proteine wurden nach Sedimentation (20 Minuten, 27 000 x g) in Aufschlußpuffer gelöst und über Nacht dialysiert.

9. Säulenchromatographische Methoden

Die auf den folgenden Seiten beschriebenen Reinigungsmethoden nutzen die physikochemischen Eigenschaften der Strictosidin-Synthase aus. Einige Schritte konnten in enger Anlehnung an TREIMER (1979) konzipiert werden, da Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt des Enzyms bereits bekannt waren, andere wurden im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt. Die Anreicherung wurde bei 0°C - 4°C durchgeführt.

9.1. Gelfiltration an ACA 44

Die Auftrennung eines komplexen Proteingemisches durch Gelchromatographie beruht auf dem unterschiedlichen Molekulargewicht einzelner Komponenten. Gelfiltrationsme-

dien verfügen über Poren definierter Abmessungen. In diese können kleine Moleküle mehr oder weniger vollständig eindringen, größere Moleküle dagegen werden zusammen mit der Pufferfront eluiert. Als Anreicherungsmethode von Enzymen ist die Gelfiltration besonders geeignet, da Proteine in der Regel nicht direkt mit der Matrix in Wechselwirkung treten und daher hohe Aktivitätsausbeuten erzielt werden können.

Für diesen ersten Chromatographieschritt der Strictosidin-Synthase stand eine Säule präparativen Ausmaßes (5 x 95 cm), gefüllt mit Ultrogel ACA 44 der Firma LKB in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH, zur Verfügung. Proben wurden vor der Aufgabe zunächst klarzentrifugiert (15 Minuten, 48 000 x g) und zur Unterschichtung des Säulenbettüberstandes mit Glycerin (Endkonzentration 5%) versetzt. 160 Fraktionen zu 16 ml wurden bei einer Flußrate von 80 ml/h gesammelt.

9.2. Hydrophobe Chromatographie an Matrex Gel Red A und Matrex Gel Blue A

Matrex Gele der Firma Amicon besitzen ein Grundgerüst aus quervernetzter Agarose, an welches kovalent aromatische Farbstoffmoleküle gebunden sind. Diese Liganden haben in ihrer Raumstruktur große Ähnlichkeit mit Nukleotid-Cosubstraten und begünstigen die Affinitätschromatographie von Dehydrogenasen und Kinasen. Aber auch Cofaktor-unabhängige Enzyme können an solche Medien adsorbieren, wenn sie über genügend hydrophobe Bereiche verfügen. Für die Reinigung der Strictosidin-Synthase sind im folgenden zwei Varianten erläutert. Da das Bindungsverhalten dieses Enzyms nicht vorausgesagt werden konnte, mußten zunächst empirisch geeignete Bedingungen gefunden werden.

Zur Chromatographie an Matrex Gel Red A wurde die Probe gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH dialysiert, klarzentrifugiert (15 Minuten, 48 000 x g) und anschließend auf die mit Phosphatpuffer äquilibrierte Säule (1.5 x 16 cm, Flußrate 10 ml/h) gepumpt. 40 Fraktionen zu 2 ml wurden aufgefangen. Unter den gewählten Bedingungen adsorbierte die Strictosidin-Synthase nicht an diese Matrix. Das Gel wurde durch Waschen mit 80 ml 1.5 M NaCl in Phosphatpuffer regeneriert.

Dasselbe Ergebnis wurde bei der Chromatographie an Matrex Gel Blue A erreicht. Bei pH 7 und niedriger Salzkonzentration liegt die Strictosidin-Synthase also offensichtlich als stark hydratisiertes Protein vor, das keine Affinität zu einem hydrophoben Medium aufweist. Bindungskräfte dieser Art können jedoch durch Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke erheblich vergrößert werden. Vorversuche zur Adsorption der Strictosidin-Synthase an Matrex Gel Blue A wurden bei pH 4.5 und Ammoniumsulfatkonzentrationen zwischen 5% und 30% durchgeführt. Erst bei 25% gesättigter Lösung konnte die Enzymaktivität vollständig an das Gel gebunden werden, einer Salzkonzentration, die nur geringfügig von der zur Präzipitation notwendigen Ammoniumsulfatmenge abweicht.

Zur präparativen Chromatographie wurden die folgenden Bedingungen gewählt. Die Probe wurde über Nacht gegen 25 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 4.5 dialysiert, klarzentrifugiert (15 Minuten, 48 000 x g), bis zu 25% Sättigung mit festem Ammoniumsulfat versetzt und anschließend auf die äquilibrierte Säule (0.8 x 4.5 cm, Flußrate 5 ml/h) gegeben. Das Gelbett wurde solange mit Äquilibrierungspuffer (25 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 4.5, 25% Ammoniumsulfat) gewaschen, bis im Durchlauf kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte.

te. Die Desorption erfolgte durch einen stufenweisen Wechsel zu 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7. 40 Fraktionen zu 1.5 ml wurden gesammelt und das aktive Eluat gegen einen Überschuß Phosphatpuffer dialysiert.

9.3. Chromatofokussierung an PBE 94

Die Chromatofokussierung ist eine erst kürzlich von SLUYTERMAN und ELGERSMA (1978) entwickelte Technik. Wie bei der isoelektrischen Fokussierung beruht das Prinzip auf der Trennung eines Proteingemisches nach den isoelektrischen Punkten seiner Komponenten. Bezüglich der methodischen Durchführung bietet die Chromatofokussierung jedoch wesentliche Erleichterungen. Ein Ionenaustauscher wird zunächst mit einem Startpuffer äquilibriert und anschließend mit dem Elutionspuffer, dessen pH-Wert die untere Grenze des gewünschten Gradienten markiert, gewaschen. Während des Durchflusses werden die geladenen Gruppen der Matrix titriert, so daß sich ein kontinuierlicher pH-Gradient entlang der Säule ausbildet.

Der verwendete Ionenaustauscher PBE 94 und der Elutionspuffer PB 74 stammten von der Firma Pharmacia. Das 0.8 x 50 cm hohe Gelbett wurde zunächst mit 25 mM Piperazin/HCl-Puffer pH 5.5 äquilibriert und mit 40 ml Polybuffer/HCl pH 4.0 (Verdünnung 1:10) vorgewaschen. Nach Aufpumpen der Probe (in 10 mM Piperazin/HCl-Puffer pH 5.5, Flußrate 20 ml/h) wurde die pH-Elution mit 240 ml verdünntem Polybuffer fortgesetzt. Unmittelbar nach Messung des pH-Wertes wurden alle Fraktionen (Volumen 2 ml) neutralisiert und die Strictosidin-Synthase-Aktivität bestimmt.

9.4. Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose DE 52

Die Ionenaustauscherchromatographie wurde schon 1956 von PETERSON und SOBER in die Biochemie eingeführt. Eine unlösliche Matrix ist mit funktionellen Gruppen besetzt, die in Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Lösungsmittels Ladungen tragen. Bei der Enzymreinigung haben sich bevorzugt schwache Kationenaustauscher (CM-Cellulose) und schwache Anionenaustauscher (DEAE-Cellulose) durchgesetzt. Das Bindungsverhalten eines betrachteten Proteins wird dabei allein von seinem isoelektrischen Punkt bestimmt. Zwei unterschiedliche Elutionsmethoden sind möglich. Mit dem Wechsel des pH-Wertes des verwendeten Puffers kommt es zur Desorption aufgrund der geänderten Nettoladung des Proteins und bei Erhöhung der Ionenkonzentration werden adsorbierte Proteine von der geladenen Matrix verdrängt.

Die Strictosidin-Synthase wurde in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8.0 an DEAE-Cellulose DE 52 der Firma Whatman Biochemicals gebunden (Säulenbett 1.5 x 6 cm, Flußrate 20 ml/h). Nach Vorwaschen mit 130 ml 100 mM KCl in Tris-Puffer erfolgte die Elution mit einem linearen Salzgradienten von 100 mM - 400 mM KCl. 120 Fraktionen zu 3.2 ml wurden gesammelt.

10. Elektrophoresen in Polyacrylamidgelen

Elektrophoretische Techniken eignen sich aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens besonders zur Überprüfung der Reinheit eines Proteins. Als Matrix hat sich neben Materialien wie Cellulose-Acetat, Stärke und Agarose ein synthetisches Polymer aus Acrylamid und Bisacrylamid bewährt, das abhängig von der gewählten Monomerenkonzentration über Poren unterschiedlicher Weite

verfügt. Die Auftrennung eines Proteingemisches im elektrischen Feld erfolgt nach zwei Kriterien, Nettoüberschußladung und Molekülgröße der einzelnen Komponenten. In der SDS-Gelelektrophorese wird die Eigenladung der Proteine durch Anlagerung des ionischen Detergens maskiert, so daß die Separation hierbei allein auf unterschiedlichem Molekulargewicht basiert.

Alle beschriebenen Elektrophoresen wurden in zylinderförmigen Glasröhrchen mit 5 mm Innendurchmesser durchgeführt. Auf das Trenngel (Länge 7 cm) wurde ein 1.5 cm langes Sammelgel polymerisiert. Der Fortgang der Elektrophorese wurde durch Zugabe von 10 μ l einer 0.01% igen Bromphenolblaulösung in jede Probe verfolgt.

10.1. Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese

Routinemäßig wurde für analytische Zwecke, für die semipräparative Reinigung der Strictosidin-Synthase als letztem Anreicherungs-schritt und für alle zur Immunisierung vorgesehenen Enzympräparationen das System nach DAVIS (1964) verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgellösungen wurde dem Buch von MAURER (1971) entnommen. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte im Sammelgel (2.5% Acrylamid) bei pH 8.3 und einer Stromstärke von 2 mA/Röhrchen, die Auftrennung im Laufgel (7.5% Acrylamid) bei pH 9.5 und einer Stromstärke von 3 mA/Gel.

In den unter III.4.3. geschilderten Versuchen fand zusätzlich das System nach WILLIAMS und REISFELD (1964) Verwendung, dessen Zusammensetzung ebenfalls von MAURER (1971) detailliert beschrieben wird. Bei gleichen Acrylamidkonzentrationen werden Proteine hier we-

niger extremen pH-Werten ausgesetzt (Konzentrierung pH 7, Auftrennung pH 8).

Zur Lokalisation der Strictosidin-Synthase-Aktivität wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese in 1 mm oder 2 mm dicke Segmente unterteilt. Jede Scheibe wurde 24 h bei 4°C mit 0.1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 eluiert und je ein Aliquot für den Standardenzymtest entnommen.

Zur Anfärbung von Proteinen wurden die Gele 1 h - 12 h in 0.1% Amidoschwarz oder 0.25% Coomassie Brilliant Blue (II.10.3.) inkubiert.

10.2. SDS-Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Gelelektrophoresen wurden in Anlehnung an die von WEBER und OSBORN (1969) beschriebene Methode durchgeführt.

Proteinlösungen wurden zunächst mit einem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt und durch 5 minütige Inkubation bei 100°C denaturiert. Die Konzentration und Auftrennung der Proteine erfolgte ungekühlt im Alkalischen, wie unter II.10.1. für das System von DAVIS (1964) beschrieben, bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/Röhrchen und einer Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und 10% im Laufgel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in 0.25% Coomassie Brilliant Blue (II.10.3.) angefärbt.

10.3. Färbelösungen

Proteinfärbelösungen

0.1 g Amidoschwarz 10 B
45 ml Essigsäure
45 ml Methanol
10 ml Wasser
Entfärbung durch 7% Essigsäure

0.25 g Coomassie Brilliant Blue R-250
10 ml Essigsäure
45 ml Methanol
45 ml Wasser
Entfärbung durch 7.5% Essigsäure, 5% Methanol

Um unmittelbar nach der elektrophoretischen Trennung die Strictosidin-Synthase gezielt aus einem Gemisch mehrerer Proteinbanden ausschneiden zu können, wurde die Methode nach HARTMAN und UDENFRIEND (1969) angewandt. Dazu wurde das Gel zunächst ca. 5 Sekunden in 3 N HCl eingetaucht und anschließend kurz in 0.003% iger ANS-Lösung in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 6.8 inkubiert. ANS lagert sich dabei an die hydrophoben Bereiche von Proteinen an, die unter UV-Bestrahlung als gelb fluoreszierende Banden sichtbar werden. Die Ausbeute an Strictosidin-Synthase-Aktivität wurde durch diese Vorbehandlung kaum beeinflusst.

Der Nachweis von Glykoproteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte nach FELGENHAUER (1970). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Perjodatlösung:

2.5 g Natriumperjodat
1.0 g Trichloressigsäure
2.5 ml konz. HCl
10 ml Essigsäure
86 ml Wasser

SCHIFF'sches Reagenz:

0.5 g Pararosanilin

15 ml 1 N HCl

85 ml 0.5% NaHSO₃

Die Lösung wurde 24 h bei 4°C gerührt und anschließend 1 g Aktivkohle (Sigma) hinzugefügt. Nach Filtration ergab sich eine klare, farblose Flüssigkeit.

Die Gele wurden zunächst 16 h in der Perjodatlösung inkubiert und 8 h in 10% Essigsäure, 1% Trichloressigsäure gewaschen. Nach 16 stündiger Anfärbung mit SCHIFF'schem Reagenz wurden sie anschließend 2 x 2 h mit einer Lösung aus 1 g NaHSO₃, 20 ml konz. HCl und 980 ml Wasser gewaschen und in 7% iger Essigsäure aufbewahrt. Glykosidierte Proteine werden bei dieser Prozedur als rote Banden im Gel signalisiert.

11. Molekulargewichtsbestimmungen

Das Molekulargewicht der Strictosidin-Synthase wurde durch zwei unterschiedliche Methoden bestimmt. Für die Gelfiltration genügen dazu unreine Präparationen, da das Elutionsverhalten des untersuchten Proteins anhand der Enzymaktivität verfolgt werden kann. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit läßt sich durch Vergleich mit Standardproteinen unter Annahme einer globulären Gestalt und gleicher Ladungsdichte das Molekulargewicht berechnen (ANDREWS 1964, 1965). Die SDS-Gelelektrophorese setzt dagegen homogene Präparate voraus. Die Detektion erfolgt mittels eines Proteinfarbstoffes. Für die Erstellung einer Eichgeraden wird die relative Mobilität von Standardproteinen bezüglich der Bromphenolblaufront bestimmt. Unter der Voraussetzung, daß für alle Proteine das Verhältnis von gebundenem SDS zur Molekülgröße gleich ist, läßt sich daraus das Molekulargewicht des untersuchten Proteins ablesen (WEBER und OSBORN, 1969).

11.1. Gelfiltration an Sephadex G-100

Aus 25 g eingefrorenem Gewebe wurde ein Rohextrakt hergestellt (II.8.2.) und durch Ultrafiltration auf 2 ml konzentriert. Nach Zugabe von 0.1 ml Glycerin wurde die Lösung auf die mit Aufschlußpuffer äquilibrierte Säule (1.6 x 95 cm, Trennbereich 4 000 - 150 000 Dalton, Flußrate 10 ml/h) gepumpt. 140 Fraktionen zu 1 ml Volumen wurden aufgefangen. Als Standardproteine wurden verwendet

Ferritin	(MG 450 000)	zur Markierung des Ausschlußvolumens,
Rinderserumalbumin	(MG 67 000),	
Ovalbumin	(MG 43 000),	
Trypsininhibitor	(MG 20 100)	aus der Sojabohne,
Cytochrom c	(MG 12 500).	

11.2. SDS-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte, wie bereits unter II.10.2. beschrieben. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein von Pharmacia erhältlicher Satz an Eichproteinen mit

Phosphorylase b	(MG 94 000),
Rinderserumalbumin	(MG 67 000),
Ovalbumin	(MG 43 000),
Carboanhydrase	(MG 30 000),
Trypsininhibitor	(MG 20 100) aus der Sojabohne,
α -Lactalbumin	(MG 14 400).

12. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde im Rahmen dieser Arbeit zur analytischen Auftrennung der Strictosidin-Synthase-Proteine eingesetzt. Als Matrix werden dazu häufig Polyacrylamidgele verwendet, in welche Trägerampholyte eingegossen werden. Im elektrischen Feld ordnen sich diese in der Reihenfolge ihrer isoelektrischen Punkte an und erzeugen dadurch einen kontinuierlichen pH-Gradienten. Da die Acrylamidkonzentration gering gehalten wird, können Proteine ungehindert im Gel wandern, bis sie den pH-Bereich ihres isoelektrischen Punktes erreicht haben, wo sie zu scharfen Banden fokussieren.

Im folgenden ist ein System in Anlehnung an RIGHETTI und DRYSDALE (1976) beschrieben. Die verwendeten Trägerampholyte stammten von der Firma LKB.

Lösung 1:

30 g Acrylamid
1.2 g Bisacrylamid

ad 100 ml H_2O

Gelmischung:

1.8 ml H_2O
3.0 ml 25% (w/v) Saccharose
0.85 ml Lösung 1
0.3 ml Ampholine Trägerampholyte pH 4.0 - 6.5
0.05 ml TEMED (1:100 verdünnt)
0.05 ml 2% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Kathodenlösung (obere Kammer):

2.0 g NaOH/l

Anodenlösung (untere Kammer):

1.0 ml H_2SO_4 /l

Es wurden 7.5 cm lange Rundgele (5 mm Innendurchmesser) mit 4.4% Acrylamid/Bisacrylamid und 2% Ampholine polymerisiert. Um den Kontakt der aufzutrennenden Proteine

mit der alkalischen Elektrodenlösung zu vermeiden, wurden auf jedes Gel zunächst 50 μ l 1% Ampholine, 5% Saccharose gegeben. Die Proben wurden zur Entfernung störender Salze gegen H_2O dialysiert, mit 10 μ l 0.01% iger Bromphenolblaulösung und 10% Saccharose versetzt und durch Unterschichten des Ampholine/Saccharose-Gemisches direkt auf die Geloberfläche pipettiert. Die Fokussierung wurde bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 0.5 mA/Gel bis zum Erreichen einer Spannung von 400 V durchgeführt und anschließend noch weitere 2.5 h bei dieser Spannung belassen.

Für die Bestimmung des pH-Gradienten wurde ein Gel in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und jedes Segment mehrere Stunden bei Raumtemperatur mit 0.5 ml 10 mM KCl eluiert.

Die Strictosidin-Synthase wurde durch Inkubation von 1 mm Gelsegmenten in je 0.1 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 bei 4°C eluiert. Ein Aliquot wurde für die Messung der Enzymaktivität im Standardtest verwendet.

13. Erzeugung von Antikörpern gegen die Strictosidin-Synthase

Die Strictosidin-Synthase war das erste Enzym, gegen das in diesem Arbeitskreis Antikörper erzeugt werden sollten. Reichhaltige Erfahrung herrschte aber bereits im Umgang mit Antiseren gegen Haptenkonjugate für die Bestimmung pflanzlicher Sekundärstoffe durch Radioimmuntests (WEILER, 1977). Die angewandte Immunisierungsprozedur und die Gewinnung der Seren stützten sich weitgehend auf diese Vorkenntnisse.

Als Immunogene wurden unterschiedliche Enzympräparationen verwendet, deren Isolation im Ergebnisteil de-

tailliert beschrieben wird. Die Antigen-haltigen Lösungen ($25 \mu\text{g}$ - $100 \mu\text{g}$ Protein in PBS) wurden mit dem gleichen Volumen kompletten FREUND'schen Adjuvant versetzt und durch kurzes Beschallen (3×3 Sekunden) am Sonifier S 125 der Firma Branson emulgiert. Kaninchen wurden 4 mal in wöchentlichem Abstand durch subkutane Injektionen der frisch bereiteten Emulsion immunisiert und erhielten anschließend im Rhythmus von 4 Wochen intramuskuläre Boosterinjektionen ($50 \mu\text{g}$ - $200 \mu\text{g}$ Protein in PBS mit komplettem FREUND'schem Adjuvant) in die Hinterläufe. Blut wurde jeweils 1 und 2 Wochen nach jeder Boosterdosis aus der Ohrvene entnommen und zur Gerinnung 2 h bei Raumtemperatur und 12 h bei 4°C gelagert. Der Überstand wurde vom Blutkuchen abgegossen, 10 Minuten bei $12\,000 \times g$ zentrifugiert und das gewonnene Antiserum portionsweise bei -20°C aufbewahrt. Frau E.Schecklies danke ich für die Durchführung der Injektionen und Blutabnahmen.

14. Immunologische Methoden

Voraussetzung bei der Arbeit mit polyklonalen Antikörpern, die gegen ein isoliertes Protein gerichtet sind, ist zunächst die qualitative Untersuchung der gewonnenen Seren. Seit der Entdeckung von OUDIN (1946), daß bei der Diffusion in Gelen ein Antigen mit seinem entsprechenden Antikörper nur ein Präzipitat ausbildet, während das Erscheinen mehrerer Präzipitationslinien auf das Vorhandensein unterschiedlicher Antigen/Antikörper-Paare zurückzuführen ist, sind trägergebundene immunologische Techniken in vielen Variationen entwickelt worden. Doppeldiffusion, Immunelektrophorese und zweidimensionale Immunelektrophorese eignen sich zur analytischen Überprüfung der Reinheit von Antigen- oder Antikörperlösungen, die "Rocket"-Immunelektrophorese ermöglicht darüberhinaus die Quantifizierung unbekannter Proteingemische.

14.1. Bestimmung des Antikörpertiters

Wird ein Enzym als Immunogen verwandt, so kann der Nachweis spezifischer Antikörper in vielen Fällen auch über die Hemmung der katalytischen Aktivität erbracht werden. Dies wurde z.B. für die Hexokinase aus Hefe (MILLER et al., 1949) oder für Bromelain (SASAKI et al., 1973) beschrieben. Die gegen die Strictosidin-Synthase erzeugten Seren wurden ebenfalls auf diese Eigenschaft hin untersucht. Es konnte ein einfacher, quantitativer Test ausgearbeitet werden, der in seiner Durchführung jedoch nicht zwischen Präzipitation und Neutralisation der Enzymaktivität unterscheidet.

Variierende Volumina der Antiserumfraktionen wurden mit einer konstanten Aktivität angereinigter Strictosidin-Synthase (29 pkat, III.1.3.) und 1% BSA in PBS 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Gesamtvolumen 0.1 ml). Nach 5 minütiger Zentrifugation (10 000 x g) wurden 50 μ l des Überstandes in den Standardenzymtest eingesetzt. Zur quantitativen Auswertung wurde das zu 50% iger Unterdrückung der Enzymaktivität notwendige Serumvolumen herangezogen.

14.2. Isolation der Immunglobulinfraktion aus Kaninchenserum

Die Reinigung von γ -Globulinen erfolgte nach HARBOE und INGILD (1973).

Das Antiserum wurde zunächst einer 0 - 40% igen Ammoniumsulfatfraktionierung unterworfen, 30 Minuten bei 4 000 x g zentrifugiert und das Präzipitat zweimal mit 1.75 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Das Sediment wurde anschließend in H_2O aufgenommen und bei 4°C zweimal im Wechsel gegen H_2O und Acetatpuffer (50 mM

Natriumacetat, 21 mM Essigsäure, pH 5.0) dialysiert. Der Niederschlag, der sich während der Dialyse bildete, wurde abzentrifugiert, der Überstand auf eine mit Acetatpuffer äquilibrierte DEAE Sephadex A-50 Säule (2 x 25 cm, Flußrate 20 ml/h) gepumpt und mit insgesamt 100 ml Puffer nachgewaschen. Antikörper-haltige Fraktionen (Volumen 2 ml) wurden mit dem unter II.14.1. beschriebenen Test identifiziert, durch Ammoniumsulfatfällung (0 - 40%) konzentriert und gegen PBS dialysiert.

Die Ausbeute an aktiven Immunglobulinen betrug 94% (II.14.1.), der Proteingehalt wurde anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten bestimmt ($O.D._{280} \cdot 1.46 = 1 \text{ mg IgG/ml}$).

14.3. Reaktionen zum Nachweis spezifischer Antigene und Antikörper in Agarosegelen

Für die im folgenden erläuterten Methoden wurden die Flachbettelektrophoresekammer Multiphor 2117 der Firma LKB und eine zugehörige Ausrüstung für Immuntechniken, bestehend aus Glasplatten (84 x 94 x 1 mm), Schablonen und Gelstanzen, verwendet.

Alle Versuche wurden in ca. 1 mm dicken Gelen auf vorbeschichteten Platten durchgeführt. Dazu wurde 1 g Agarose (Sigma, mittlere Elektroendosmose) mit 100 ml 0.02 M Barbituratpuffer pH 8.6 kurz zum Kochen gebracht. Ein dünner Film (0.5 ml) wurde gleichmäßig auf den entfetteten Glasplatten verteilt. Nach dem Eintrocknen bei 60°C im Hitzeschrank wurde darauf ein Gel aus 10 ml geschmolzener Agarose gegossen. In die erstarrte Matrix wurden Löcher und Rillen entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung gestanzt. Elektrophoresen wurden bei 10°C unter Verwendung des bereits be-

schriebenen Barbituratpuffers als Elektrodenlösung durchgeführt. Der Kontakt zum Agarosegel wurde durch 5 Lagen Filterpapier (Whatman, Grade I) hergestellt. Da in der Regel verdünnte Antigenlösungen eingesetzt wurden, waren die ausgebildeten Präzipitate häufig nur undeutlich als Trübungen zu erkennen. Zur Intensivierung wurden daher routinemäßig alle Versuchsplatten mit einem Proteinfarbstoff behandelt. Dazu wurden die Gele nach erfolgter Immunreaktion zunächst 3 x 24 h in 2% iger NaCl-Lösung und 2 x 24 h in H₂O gewaschen. Anschließend wurden sie 12 h in Amidoschwarz (II.10.3.) inkubiert, mit 7% iger Essigsäure entfärbt und an der Luft getrocknet.

Für alle Versuche wurden gereinigte Immunglobulinfraktionen (II.14.2.) verwendet.

14.3.1. Doppeldiffusion

Der Test wurde in einer typischen Anordnung von sechs äußeren und einem zentralen Brunnen zur Aufnahme der Antigen- und Antikörperlösungen durchgeführt (OUCHTERLONY, 1958). Die Diffusion erfolgte 24 h - 48 h bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre.

14.3.2. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) stellt eine Weiterentwicklung der Doppeldiffusion dar. Strictosidin-Synthase-haltige Lösungen wurden zunächst 30 Minuten bei 10 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Immunglobuline in Brunnen, die parallel zur Wanderungsrichtung der Antigene ausgehoben werden, einpipettiert. Die Diffusion erfolgte, wie bereits für den OUCHTERLONY-Test (II.14.3.1.) erläutert.

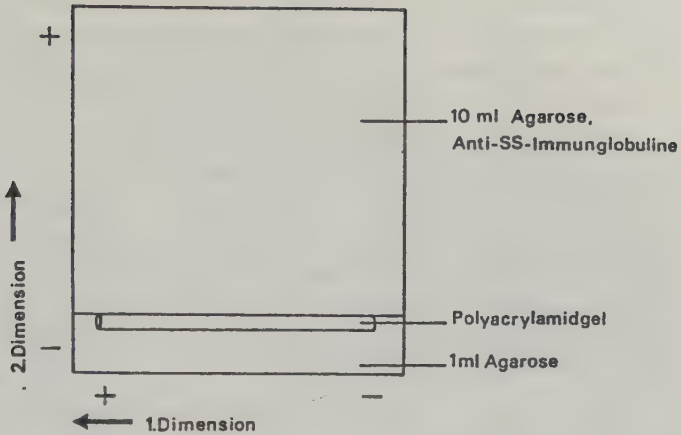


Abb. 5: Schematische Versuchsanordnung für die zweidimensionale Immunelektrophorese

1. Dimension: Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel nach DAVIS (1964)
2. Dimension: Das Polyacrylamidgel wurde zur Kathode hin in ca. 1 ml 1% Agarose eingegossen. Auf der Anodenseite wurde anschließend das Strictosidin-Synthase-Antikörperhaltige Agarosegel angefügt.

14.3.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Das Auflösungsvermögen der von GRABAR und WILLIAMS (1953) beschriebenen Methode kann weiter erhöht werden, wenn der Immunreaktion eine Auftrennung der Antigene durch Polyacrylamidgelelektrophorese oder isoelektrische Fokussierung vorausgeht und die Präzipitattbildung selbst mit einer zweiten Elektrophorese verknüpft wird. Das gewählte Verfahren orientiert sich an den Ergebnissen von LAURELL (1965).

Die Elektrophorese in Polyacrylamid erfolgte wie unter II.10.1. erläutert. Ein Gel wurde in Amidoschwarzlösung gefärbt, ein anderes wurde im rechten Winkel zu der

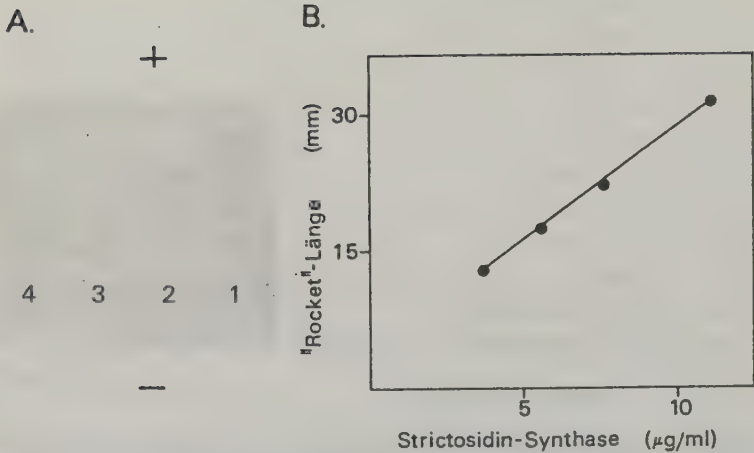


Abb. 6: "Rocket"-Immunelectrophorese der Strictosidin-Synthase

A: Photographie einer Versuchsplatte

1: 11.1 µg Strictosidin-Synthase/ml

2: 7.6 µg Strictosidin-Synthase/ml

3: 5.6 µg Strictosidin-Synthase/ml

4: 3.7 µg Strictosidin-Synthase/ml

B: Eichgerade

1. Dimension in ein Antikörper-haltiges Agarosegel (II.14.3.4.) eingegossen (Abbildung 5). Die zweite Elektrophorese wurde 12 h bei 4 V/cm durchgeführt.

14.3.4. "Rocket"-Immunelectrophorese

Quantitative Bestimmungen erfolgten durch "Rocket"-Immunelectrophorese nach LAURELL (1966).

Genau 10 ml der geschmolzenen Agarose wurden in ein Reagenzglas pipettiert und die Temperatur laufend mit einem Thermometer kontrolliert. Bei 55°C wurde ein konstantes Volumen gereinigter Immunglobuline zugegeben und nach Durchmischung die Lösung zügig auf einer vor-

bereiteten Glasplatte ausgegossen. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurden jeweils 15 μ l unterschiedlicher Verdünnungen einer homogenen Strictosidin-Synthase-Präparation (Enzym III, III.1.5.) in die ausgehobenen Brunnen pipettiert. Die Elektrophorese wurde 12 h bei 4 V/cm durchgeführt. Die Auswertung einer Versuchsplatte ist in Abbildung 6 dargestellt. Bei der Bestimmung Strictosidin-Synthase-haltiger Proteinlösungen unbekannter Konzentration wurden Abweichungen von der Eichkurve durch gleichzeitige Elektrophorese eines internen Standards (11.1 μ g Strictosidin-Synthase/ml) korrigiert.

14.4. Kopplung von Meerrettichperoxidase an Immunglobuline

Peroxidase-konjugierte Antikörper wurden erstmals von NAKANE und PIERCE (1966) zur Lokalisation von Antigenen in Gewebeverbänden benutzt. Die im folgenden für Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline beschriebene Methode stellt eine verbesserte Modifizierung der ursprünglichen Vorschrift dar (WILSON und NAKANE, 1978). Durch Perjodatspaltung werden zunächst Aldehydgruppen im Kohlehydratteil der Peroxidase erzeugt. Diese reagieren mit primären Aminen (z.B. ϵ -NH₂-Gruppen des Lysins der Immunglobuline) unter Ausbildung eines Zwischenproduktes mit Iminstruktur, das durch NaBH₄-Reduktion stabilisiert wird.

6.7 mg Meerrettichperoxidase (Sigma, RZ 3.0) in 1.7 ml H₂O wurden zusammen mit 0.33 ml 0.1 M Natriummetaperjodat 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Dialyse gegen 1 mM Natriumacetatpuffer pH 4.4 wurde die Lösung mit 0.2 M Natriumcarbonatpuffer pH 9.5 auf pH 9 eingestellt und sofort 13.3 mg affinitätsgereinigte Immunglobuline (III.3.1.3., in 10 mM Natriumcarbonatpuffer

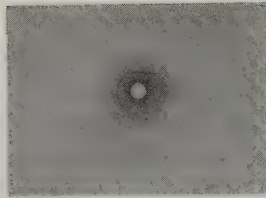


Abb. 7: Aktivitätsanfärbung nach Immunpräzipitation der Strictosidin-Synthase durch Peroxidase-gekoppelte Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline
Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

pH 9.5) dazugegeben. Nach 2 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit 0.17 ml NaBH_4 -Lösung (4 mg/ml 10 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9.5) versetzt und weitere 2 h bei 4°C inkubiert. Zur Abtrennung nicht gekoppelter Peroxidase wurde anschließend eine 0 - 50% ige Ammoniumsulfatfraktionierung durchgeführt, der Niederschlag in 1 ml PBS gelöst und über Nacht dialysiert. Das Konjugat wurde bei 4°C unter Zugabe von 50% Glycerin gelagert.

Antikörper-gebundene Peroxidase wurde durch Aktivitätsfärbung des Immunpräzipitates nachgewiesen (Abbildung 7). Dazu wurden in die äußeren Brunnen eines Doppeldiffusionstestes verschiedene Verdünnungen einer Strictosidin-Synthase-Präparation (III.1.5., 1.27 μg - 0.04 μg Protein) und in das zentrale Loch 30 μl des Kopplungsproduktes pipettiert. Nach 24 stündiger Diffusion war ein deutlicher Präzipitatring zu erkennen. Gelöste Proteine wurden mit 2% iger NaCl-Lösung und H_2O ausgewaschen und die Glasplatte anschließend zur Färbung ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 50 ml PBS, 25 mg 3,3'-Diaminobenzidin und 25 μl H_2O_2 (30%) inkubiert. Peroxidase-Aktivität wird dabei durch einen braunen Niederschlag angezeigt. Mit dem un-

ter II.14.1. erläuterten Test wurde die Immunreaktivität des Kopplungsproduktes bezogen auf die eingesetzte Antikörperaktivität zu 40% bestimmt.

15. Immobilisation an CNBr-aktivierten Trägern

Die kovalente Fixierung von Proteinen oder Peptiden an eine mit Bromcyan aktivierte Polysaccharidmatrix wurde 1967 von PORATH und Mitarbeitern beschrieben (AXEN et al., 1967, PORATH et al., 1967). Die Kopp-
lung erfolgt über primäre Aminogruppen des Liganden und führt zu den in Abbildung 8 dargestellten Haupt-
reaktionsprodukten. Die Möglichkeiten, Moleküle an unlösliche Trägermaterialien zu binden, haben seitdem um ein Vielfaches zugenommen. Praktische Anwendung finden solche derivatisierten Gele in der Affinitäts-
chromatographie oder zur Herstellung wiederverwendba-
rer Biokatalysatoren. Beide Varianten wurden bei der Bearbeitung der Strictosidin-Synthase genutzt. CNBr-
aktivierte Sepharose stammte von Pharmacia, CNBr-ak-
tivierte, quervernetzte Agarose von Sigma. Die Kopp-
lungsreaktion wurde nach Herstellerangaben (Pharmacia) durchgeführt.

1 g aktiviertes Trägermaterial wurde in 200 ml 1 mM HCl gequollen, von der Säure durch Vakuumfiltration ab-
getrennt und anschließend sofort in der Proteinelösung (in 0.1 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl) suspendiert. Nach 2 stün-
diger Inkubation bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung wurde das Gel auf einem Büchnertrichter gründlich mit NaHCO_3 -Puffer gewaschen und zur Blockie-
rung unbesetzter Gruppen der Matrix weitere 2 h bei Raumtemperatur in 8 ml 0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 8 sus-
pendiert. Darauf wurde das Kopplungsprodukt zur Entfer-
nung unspezifisch adsorbierter Proteine je 3 mal im Wechsel mit NaHCO_3 -Puffer und 0.1 M Citrat-Phosphat-

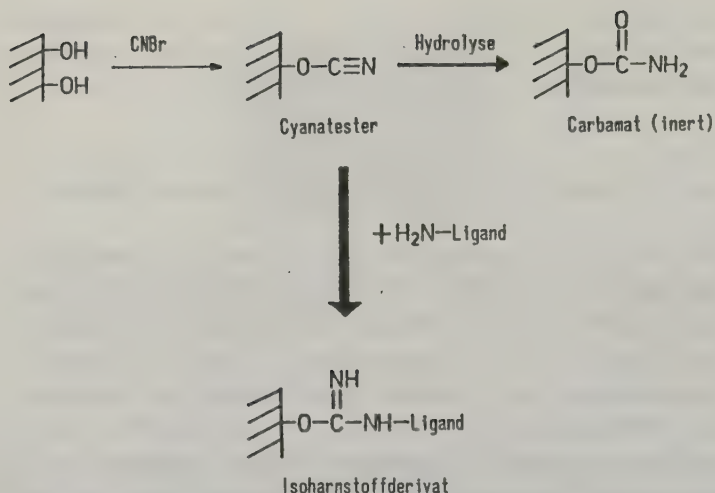


Abb. 8: Hauptreaktionsprodukte bei der Kopplung von Liganden an eine mit Bromcyan aktivierte Sepharose-Matrix (nach KOHN und WILCHEK, 1981)

Puffer pH 3.8, 0.5 M NaCl gewaschen und im Verwendungspuffer unter Zugabe von 0.02% NaN_3 bei 4°C gelagert.

16. Dünnschichtchromatographie

Die analytische Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel-DC-Folien Polygram Sil G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel & Co. (Düren). Die Verteilung nicht radioaktiv markierter Alkaloide wurde mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer KM 3 der Firma Zeiss (Oberkochen) durch Anregung bei 254 nm und Messung der Remission erfaßt.

Präparative Auftrennungen wurden auf selbstgestrichenen Kieselgeldickschichtplatten (20 x 20 cm, 2.5 cm Schichtdicke, Kieselgel GF₂₅₄ Typ 60 der Firma Merck) durchgeführt.

Folgende Fließmittel fanden Verwendung.

I:	Aceton/Methanol/Diäthylamin	= 7/1/1
II:	Chloroform/Methanol	= 4/1
III:	Benzol/Essigester	= 2/1
IV:	Aceton/Petroläther/Methanol/Diäthylamin	= 7/7/1/1
V:	Essigester/Äther/n-Hexan	= 2/2/1

17. Spektroskopische Methoden

400 MHz-¹H-NMR-Spektren wurden in CDCl₃ mit TMS als internem Standard registriert. Ich danke Herrn Dr. G.Höfle (Stöckheim) für die Messung.

Die CD-Spektren wurden freundlicherweise von Herrn Prof. G.Snatzke (Bochum) in Acetonitril aufgenommen. Die Messung von Infrarotspektren erfolgte als KBr-Preßling mit einem IR-Gitterspektrometer 257 der Firma Perkin-Elmer.

Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT 44S mit Elektronenionisation (70 eV) aufgenommen. Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. J.Stöckigt für die Registrierung. UV-Spektren wurden mit einem Zeiss DMR 11 Photometer in Methanol gemessen. Alkaloidkonzentrationsbestimmungen erfolgten anhand der beschriebenen Extinktionskoeffizienten (GABETTA und MUSTICH, 1975).

III. E R G E B N I S S E

1. Reinigung der Strictosidin-Synthase

Zur Anreicherung von Enzymen hat in den letzten Jahren neben den physikochemischen Methoden besonders das Gebiet der Affinitätschromatographie an Bedeutung gewonnen (CUATRECASAS und ANFINSEN, 1971). Dabei wird aus einem Gemisch ein Protein selektiv isoliert aufgrund seines Bindungsverhaltens beispielsweise zu einem Substrat, einem Inhibitor oder einem Antikörper, der an einer unlöslichen Matrix fixiert ist. Die Affinitätschromatographie stellt häufig die effektivste Reinigungsprozedur dar. Genutzt wurde sie erstmals von LERMAN zur spezifischen Adsorption der Tyrosinase (LERMAN, 1953). Aber auch die Palette physikochemischer Techniken konnte durch Entwicklung neuer Trennprinzipien und Materialien mit erhöhtem Auflösungsvermögen erweitert werden.

Arbeiten zur Anreicherung der Strictosidin-Synthase aus C. roseus Zellkulturen unter Anwendung klassischer Proteinreinigungsschritte (Chromatographie an DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit, Gelfiltration, präparative IEF) waren bereits von zwei Gruppen veröffentlicht worden (MIZUKAMI et al., 1979, TREIMER und ZENK, 1979 b). Übereinstimmungen ergaben sich in der Beschreibung des Molgewichtes (38 000 Dalton bzw. 34 000 Dalton durch Gelfiltration) und des isoelektrischen Punktes (4.6 bzw. 4.4 durch IEF), divergierende Resultate allerdings im beobachteten Reinheitsgrad des Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher bevorzugt andere Methoden angewandt. Zunächst soll hier eine Reinigung

beschrieben werden, die die publizierten physikochemischen Eigenschaften des Enzyms berücksichtigt.

1.1. Gewebeaufschluß

1 kg eingefrorenes Zellgewebe von C. roseus wurde, wie unter II.8.2. beschrieben, aufgeschlossen und der Rohextrakt (238.4 nkat Strictosidin-Synthase) einer 35 - 50% igen Ammoniumsulfatfraktionierung unterworfen (TREIMER, 1979). Die präzipitierten Proteine wurden nach Zentrifugation in ca. 75 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH aufgenommen und über Nacht gegen 10 Liter Puffer dialysiert.

1.2. Gelfiltration

Die während der Dialyse ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 5%) auf die Säule gepumpt (II.9.1.).

Die Fraktionen 76 - 94 (307 ml) enthielten Strictosidin-Synthase-Aktivität. Nach Einengen mit einer Berg-hof-Zelle (Typ BMU) auf ca. 8 ml wurde die Proteinlösung über Nacht gegen 5 l 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH dialysiert.

1.3. Hydrophobe Chromatographie an Matrex Gel Red A

Ausgefallene Proteine wurden durch Sedimentation entfernt und der klare Überstand auf das äquilibrierte Gelbett gegeben (II.9.2.). Abbildung 9 zeigt das Elutionsprofil.

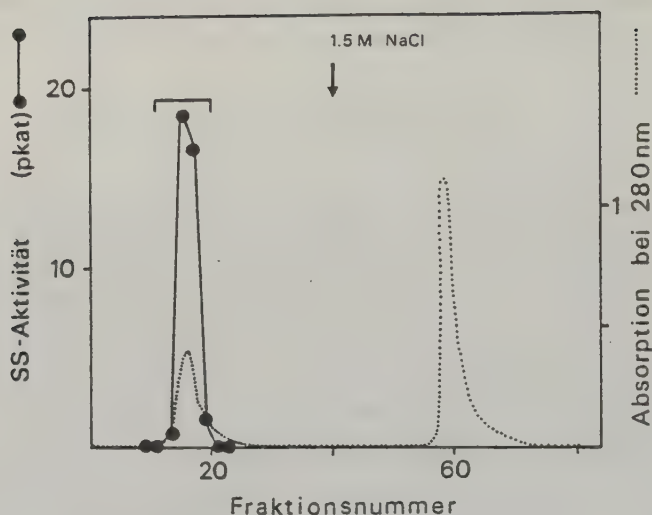


Abb. 9: Chromatographie der Strictosidin-Synthase an Matrex Gel Red A
Die Elutionsbedingungen sind im Methodenteil (II.9.2.) beschrieben.

Strictosidin-Synthase-Aktivität fand sich nur im Durchlauf der Säule. Solche, auch als negativ bezeichneten Reinigungsschritte, finden nur selten Anwendung. In den weitaus meisten Fällen ist es üblich, das untersuchte Protein zunächst an das Säulenmaterial zu binden und anschließend geeignete Bedingungen zu seiner Desorption zu suchen. Allerdings kann der Vorteil einer negativen Chromatographie, insbesondere beim Umgang mit labilen Enzymen, nicht unerheblich sein. Da das Protein nicht direkt mit der Matrix in Wechselwirkung tritt und die äußeren Bedingungen häufig milder sind, werden in der Regel hohe Aktivitätsausbeuten erzielt.

Die Fraktionen 13 - 20 (16 ml) wurden vereinigt, mit der Berghof-Zelle auf ca. 6 ml eingengt und über

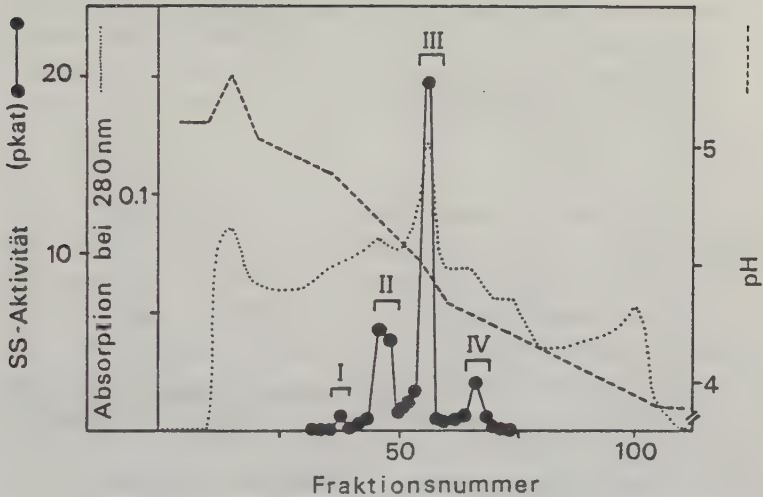


Abb. 10: Chromatofokussierung der Strictosidin-Synthase an PBE 94
Die Elutionsbedingungen sind unter II.9.3. erläutert.

Nacht gegen 5 l 10 mM Piperazin/HCl-Puffer pH 5.5 dialysiert. Die erläuterte Reinigungsprozedur führte bei 94% iger Aktivitätsausbeute zu einer 100 fach angereicherten Strictosidin-Synthase-Präparation.

1.4. Chromatofokussierung

Zwei Aufarbeitungen des vorhergehenden Schrittes wurden vereinigt, klarzentrifugiert und auf die mit 40 ml verdünntem Polybuffer/HCl pH 4.0 vorgewaschene Säule gepumpt (II.9.3.).

Die Messung des Elutionsprofils ergab eine Verteilung

A. Enzym III
Enzym II

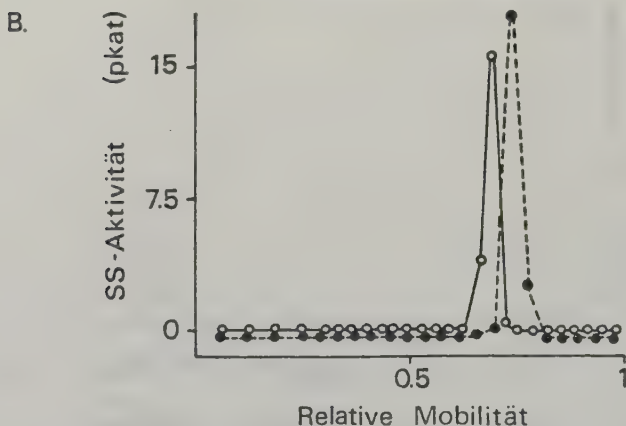


Abb. 11: Polyacrylamidgelelektrophorese der durch Chromatofokussierung getrennten Strictosidin-Synthase-Aktivitäten II (spez. Akt. 43.7 nkat/mg Protein) und III (spez. Akt. 68.2 nkat/mg Protein) nach DAVIS (1964)

A: Proteinanfärbung mit Amidoschwarz

Enzym II: 10.9 μ g Protein

Enzym III: 18.3 μ g Protein

B: Strictosidin-Synthase-Aktivitätsverteilung

Enzym II: 131 pkat (○—○)

Enzym III: 164 pkat (●—●)

der Strictosidin-Synthase über 4 diskrete Aktivitätsmaxima (Abbildung 10). Diese Trennung war in hohem Maße reproduzierbar und Strictosidinbildung durch einen Aliquot der Spitzenfraktionen 38, 46, 55 bzw. 66 konnte auch nach dünnschichtchromatographischer Analyse gezeigt werden (II.5.2.). Die Enzymaktivitäten wurden in der Reihenfolge ihrer Elution als I (p_I 4.8), II (p_I 4.6), III (p_I 4.5) und IV (p_I 4.3) bezeichnet, aktive Fraktionen für alle weiteren Untersuchungen, wie in Abbildung 10 angedeutet, vereinigt und bis zur Ver-

wendung bei -20°C gelagert. Heterogene Strictosidin-Synthase-Formen konnten auch nach Anwendung einer weiteren Trennmethode beobachtet werden. Dazu wurden die beiden Hauptenzyme II und III durch Ultrafiltration konzentriert und auf Polyacrylamidgele (DAVIS, 1964) aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung mit Amidoschwarz ergaben sich für Enzym II im Bereich der Strictosidin-Synthase-Aktivität zwei diskrete Proteinbanden, die einen niedrigeren R_f -Wert als Enzym III aufwiesen. Dieses Laufverhalten steht im Einklang mit dem weniger sauren isoelektrischen Punkt, da die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen mit einem Molgewicht $< 100\,000$ Dalton in 7.5% igen Polyacrylamidgelen überwiegend von der Nettoüberschußladung abhängt. Die Lokalisation der Enzymaktivität brachte allerdings keinen eindeutigen Aufschluß darüber, welche der beiden Banden an der Strictosidinbildung beteiligt ist. Auch die Vermutung, daß die Aktivität II mehrere Enzymproteine umfaßte, konnte zu diesem Zeitpunkt weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Enzym III enthielt dagegen nur eine einheitliche, dominante Strictosidin-Synthase-Bande, von der Fremdproteine deutlich abgetrennt wurden. Die Polyacrylamidgelelektrophorese schien daher auch zur weiteren Reinigung dieser Enzymaktivität geeignet.

1.5. Semi-präparative Polyacrylamidgelelektrophorese

Je 1.5 ml Enzym III (0.465 mg Protein) wurden gleichmäßig auf 5 Rundgele verteilt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte, wie unter II.10.1. beschrieben. Sofort nach dem Abschalten des Stromes wurden Proteine durch Markierung mit ANS sichtbar gemacht

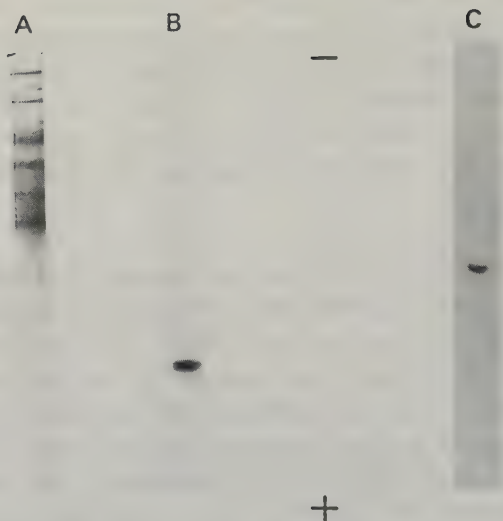


Abb. 12: Anreicherung der Strictosidin-Synthase III aus C. roseus Zellkulturen

A,B: Polyacrylamidgelelektrophorese von Enzymlösungen unterschiedlichen Reinheitsgrades nach DAVIS (1964)

Die Gele wurden mit Amidoschwarz gefärbt.

A: Ammoniumsulfatfällung (91.1 μg Protein, spez. Akt. 0.15 nkat/mg Protein)

B: Eluat nach Polyacrylamidgelelektrophorese (3.6 μg Protein, spez. Akt. 104.7 nkat/mg Protein)

C: SDS-Gelelektrophorese des gereinigten Enzyms (1.8 μg Protein, spez. Akt. 104.7 nkat/mg Protein)

Die Anfärbung erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue.

(II.10.3.), die hell fluoreszierenden Banden bei R_f 0.74 ausgeschnitten und 3 x 24 h bei 4°C mit jeweils 0.5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 inkubiert. Alle Eluate wurden vereinigt, gegen 2 l Puffer dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

Abbildung 12 dokumentiert die Anreicherung der Strictosidin-Synthase III aus C. roseus Zellkulturen. Die

Reinheit des Enzyms wurde zusätzlich durch SDS-Gel-elektrophorese (II.10.2.) überprüft (Abbildung 12 C). Nach Behandlung mit Coomassie Brilliant Blue färbte sich nur noch eine einzige Proteinbande an.

Einen Überblick über die gesamte Reinigungsprozedur gibt Tabelle 2. Enzym III wurde bei 6% iger Aktivitätsausbeute ca. 1300 fach angereichert. Die spezifische Aktivität des homogenen Präparates betrug $104.7 \text{ nkat/mg Protein}$, das entspricht bei der Einrechnung eines Molgewichtes von 31 000 Dalton (III.2.5.) einer molaren katalytischen Aktivität der Strictosidin-Synthase von 3.2 s^{-1} .

1.6. Kontrollversuche zur Enzymreinigung

Das Auftreten multipler Formen war bisher in keiner Arbeit über die Strictosidin-Synthase beschrieben worden. Um einem Irrtum vorzubeugen, wurden daher einige Experimente durchgeführt, die klären sollten, ob die beobachtete Heterogenität artifiziell während der Proteinreinigung entstehen kann.

Dabei wurden mögliche Wechselwirkungen mit den zur Chromatographie verwendeten Trägermaterialien oder mit Polybuffer, Aggregation oder Dissoziation des Enzyms bei hohen Salzkonzentrationen oder unphysiologischen pH-Werten und die Einwirkung von Proteasen (z.B. SASAKI et al., 1966) in Betracht gezogen.

Die nach Chromatofokussierung isolierte Strictosidin-Synthase-Aktivität III wurde dazu unter denselben Bedingungen an der PBE 94 Matrix rechromatographiert. Das gemessene Aktivitätsprofil ergab eine einheitliche, symmetrische Verteilung des Enzyms. Eine Aufspaltung in Nebenaktivitäten konnte nicht beobachtet werden.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicher. (x-fach)
Rohextrakt	5160	5892	476.8	0.08	100	1
Ammoniumsulfat- fraktionierung (35-50%), Dialyse	176	3145	473.3	0.15	99	2
Gelfiltration an ACA 44, Ultrafil- tration	16.2	271	473.8	1.8	99	23
Hydrophobe Chro- matographie an Ma- trex Gel Red A, Ultrafiltration	11.2	54.9	450.3	8.2	94	103
Chromatofokussie- rung an PBE 94						
Enzym I	6.6	0.63	12.4	19.6	2.6	245
Enzym II, Ultra- filtration	6.5	1.22	53.2	43.7	11.2	546
Enzym III, Ultra- filtration	4.7	1.44	98.4	68.2	20.6	853
Enzym IV	12.0	0.97	27.4	27.5	5.7	344
Polyacrylamidgel- elektrophorese En- zym III	4.0	0.28	29.8	104.7	6.2	1292

Tab. 2: Anreicherung der Strictosidin-Synthase aus 2 kg (FG) *C. roseus* Zellgewebe

Die Entstehung multipler Formen durch Oxidation während der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen, die mit Ammoniumperoxodisulfat polymerisiert wurden (BREWER, 1967), konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Nach Unterschichten eines Gemisches aus den isolierten Enzymen II und III mit $0.3 \mu\text{Mol}$ Thioglykolat wurden, wie bereits in Abbildung 11 für Standardgele (DAVIS, 1964) angedeutet, nach Behandlung mit Amidoschwarz 3 diskrete Proteinbanden bei R_f -Werten von $0.65 - 0.75$ sichtbar. Aggregation oder Dissoziation in vitro wurde durch folgenden Versuch widerlegt. Der Rohextrakt wurde unter Umgehung einer Ammoniumsulfatfällung durch Ultrafiltration konzentriert und auf eine kalibrierte Sephadex G-100 Säule aufgetragen (II.11.1.). Das so ermittelte Molekulargewicht stimmte innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen mit den für angereicherte Strictosidin-Synthase-Präparationen bereits veröffentlichten Daten überein (TREIMER und ZENK, 1979 b). Zur irreversiblen Modifizierung proteolytischer Enzyme wurde der Zellaufschluß in Gegenwart von PMSF (Konzentration 1 mM in 5% i-Propanol, FAHRNEY und GOLD, 1963) durchgeführt. Nach Dialyse des Rohextraktes gegen 10 mM Piperazin/HCl-Puffer pH 5.5 wurde die Proteinlösung anschließend direkt auf die Chromatofokussiersäule gegeben. Die Aktivitätsverteilung ergab 4 deutliche Maxima der Strictosidin-Synthase-Aktivität (s. auch Abbildung 10). Weder 5% i-Propanol noch 1 mM PMSF bewirkten dabei eine signifikante Inhibierung des Enzyms.

Da in den geschilderten Versuchen ein Isolierungsartefakt nicht nachgewiesen werden konnte, wurde bei der weiteren Bearbeitung das Vorliegen multipler Formen der Strictosidin-Synthase in vivo vorausgesetzt. Daß ihre Beschreibung hier zum ersten Mal möglich wurde, wird auf die Anwendung von Chromatographiemethoden mit erhöhtem Auflösungsvermögen zurückgeführt.

2. Charakterisierung multipler Formen der Strictosidin-Synthase

Jede der publizierten Arbeiten über die Strictosidin-Synthase (MIZUKAMI et al., 1979, TREIMER und ZENK, 1979 b) gibt eine Charakteristik der katalytischen Eigenschaften einer isolierten, einheitlichen Enzymaktivität. Die in Kapitel 1 vorgestellten Ergebnisse der Proteinreinigung stellen jedoch die beschriebenen Resultate in Frage. Bei den von den zitierten Autoren verwendeten Enzymlösungen kann es sich entweder um ein Gemisch mehrerer Proteine oder um die Hauptaktivität in reiner Form gehandelt haben. In beiden Fällen bleibt die Charakterisierung aber unbefriedigend oder unvollständig und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit wiederholt.

Für die Messung kinetischer und physikochemischer Parameter wurden von dem nach Chromatofokussierung partiell angereicherten Enzym I (spez. Akt. 19.6 nkat/mg) je 13 pkat, Enzym II (spez. Akt. 43.7 nkat/mg) je 16 pkat und Enzym IV (spez. Akt. 27.5 nkat/mg) je 14 pkat und von der homogenen Strictosidin-Synthase III (spez. Akt. 104.7 nkat/mg) je 14 pkat in den Standardaktivitätstest eingesetzt.

2.1. pH-Optimum

Enzyme sind im allgemeinen nur in einem begrenzten pH-Bereich wirksam. Das Optimum der katalytischen Umsetzung ist dabei abhängig vom Dissoziationszustand der Substratmoleküle und vom pK-Wert solcher Aminosäuren, die entweder direkt an der Produktbildung oder an der Aufrechterhaltung einer aktiven Konformation beteiligt sind.

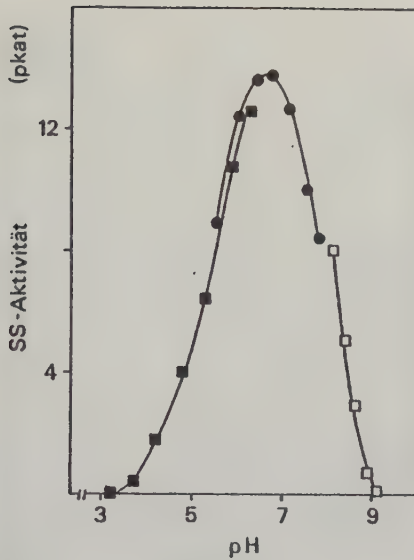


Abb. 13: pH-Abhängigkeit der Strictosidin-Synthase III
Je 14 pkat homogenes Enzym (104.7 nkat/mg Protein) wurden unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer (■), 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (●) oder 0.1 M Natriumboratpuffer (□) inkubiert.

Für die Strictosidin-Synthasen I - IV wurden in Übereinstimmung mit den publizierten Daten auffallend breite Aktivitätsprofile von pH 3.5 - pH 9.0 gemessen, die sich kaum voneinander unterschieden. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei pH 6.7 erreicht. Abbildung 13 zeigt die für Enzym III ermittelte Kurve, Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Maxima aller Aktivitäten.

Strictosidin-Synthase-Aktivität	I	II	III	IV
P_I	4.8	4.6	4.5	4.3
pH-Optimum	6.7	6.7	6.7	6.7
50% thermische Inaktivierung	47°C	48°C	46°C	48°C
Tryptamin				
K_m (mM)	0.9	6.6	1.9	2.2
V_{max} (pkat)	28.9	93.6	48.0	46.3
Inhibierung (mM)	> 0.83	> 1.5	> 0.83	> 1.0
Secologanin				
η_H	1.3	2.0	2.2	1.5

Tab. 3: Katalytische und einige physikochemische Eigenschaften der Strictosidin-Synthasen I - IV aus *C. roseus* Zellkulturen
 Der isoelektrische Punkt wurde durch Chromatofokussierung (III.1.4.) bestimmt.
 Für die Ermittlung der übrigen Daten wurden die Enzyme I (19.6 nkat/mg, je 13 pkat), II (43.7 nkat/mg, je 16 pkat) und IV (27.5 nkat/mg, je 14 pkat) nach Chromatofokussierung und homogenes Enzym III (104.7 nkat/mg, je 14 pkat) verwendet.

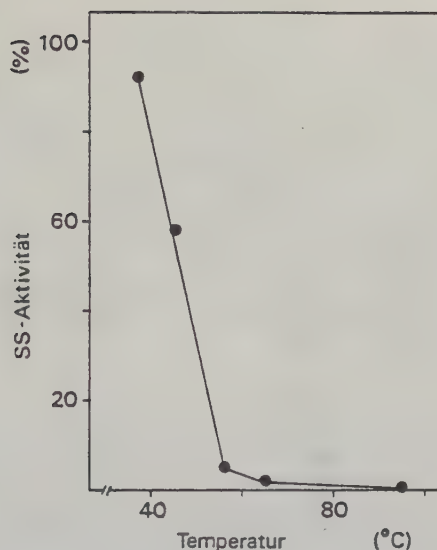


Abb. 14: Thermische Inaktivierung der Strictosidin-Synthase III
Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

2.2. Thermische Inaktivierung

Während die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen mit der Temperatur kontinuierlich ansteigt, weisen enzymkatalysierte Reaktionen ein Temperaturoptimum auf. Die Abnahme der Umsatzrate bei erhöhter Wärmezufuhr ist auf die Denaturierung des Proteins zurückzuführen, wobei die Stabilisierung einer aktiven Konformation von dessen Primärstruktur bestimmt wird (ARGOS et al., 1979).

Inaktivierungsstudien wurden für die Strictosidin-Synthasen I - IV in Gegenwart von 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 durchgeführt. Nach 10 minütiger Inkuba-

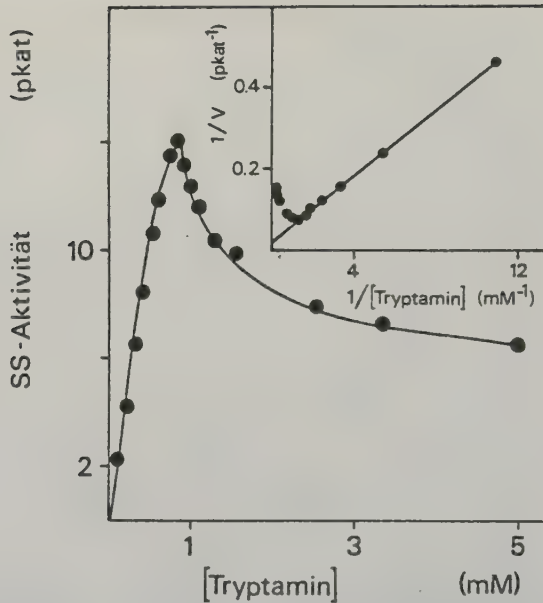


Abb. 15: Einfluß der Tryptaminkonzentration auf die Strictosidin-Synthase-Aktivität III
 Je 14 pkat homogenes Enzym (104.7 nkat/mg Protein) wurden unter Standardbedingungen mit variierender Substratmenge (0.09 mM - 5.0 mM) inkubiert.
 K_m : 1.9 mM V_{max} : 48.0 pkat

tion der Enzymlösungen bei 37°C, 45°C, 56°C, 65°C oder 95°C wurde die Restaktivität im Standardtest bestimmt und mit dem Umsatz einer unbehandelten Probe verglichen. In Abbildung 14 ist die Auswertung für das Hauptenzym III dargestellt, Tabelle 3 faßt die ermittelten Daten zusammen. Unterschiede in der Thermostabilität konnten nicht gemessen werden. Alle Strictosidin-Synthase-Proteine zeigten unter den gewählten Bedingungen einen 50% igen Aktivitätsverlust bei $47 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3. Einfluß der Substratkonzentration

Die Aufnahme von Substratabhängigkeiten für gereinigte Strictosidin-Synthase-Präparationen hatte nicht zu völlig übereinstimmenden Angaben geführt (MIZUKAMI et al., 1979, TREIMER und ZENK, 1979 b). Es wurde daher diesem Punkt unter Berücksichtigung der neuentdeckten Heterogenität des Enzyms besondere Beachtung geschenkt, zumal ein unterschiedliches kinetisches Verhalten von multiplen Enzymformen in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde (z.B. GROSSBARD und SCHIMKE, 1966).

Zur Bestimmung des K_m -Wertes für den Umsatz von Tryptamin wurde die Substratmenge des Standardtestes im Bereich von 0.09 mM - 5.0 mM variiert. In Abbildung 15 ist die graphische Auswertung der Meßdaten für die Hauptaktivität III in der Auftragung nach MICHAELIS und MENTEN sowie in der Linearisierung nach LINEWEAVER und BURK wiedergegeben. Alle Enzyme zeigten eine ausgeprägte Substrathemmung, die bei Konzentrationen zwischen 0.83 mM - 1.5 mM einsetzte (Tabelle 3). Eine inhibierende Wirkung von Tryptamin (>1.2 mM) auf die Strictosidin-Synthase-Reaktion war auch von TREIMER und ZENK (1979 b) gemessen worden. Die apparenten K_m -Werte betragen 0.9 mM für Enzym I, 6.6 mM für Enzym II, 1.9 mM für Enzym III und 2.2 mM für Enzym IV.

Die Secologaninabhängigkeit wurde im Bereich von 0.5 mM - 10 mM bei konstanter Tryptaminkonzentration (0.9 mM) aufgenommen. Für dieses Substrat zeigte die Strictosidin-Synthase kein normales Bindungsverhalten. Die doppelt reziproke Auftragung nach LINEWEAVER und BURK ergab für jede Aktivität vielmehr eine zweiphasige Kurve, wie sie bei Vorliegen einer positiven Kooperativität beobachtet wird (AHLERS et al., 1982). Dieses Phänomen zeigte sich auch in der Graphik nach

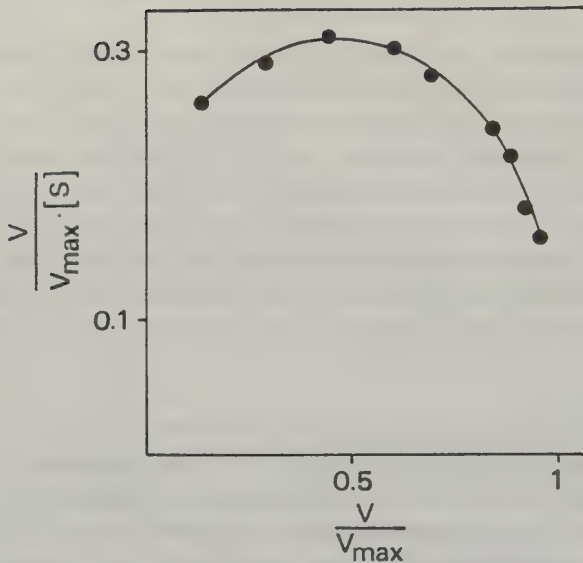


Abb. 16: EADIE-SCATCHARD-Diagramm für den Einfluß der Secologaninkonzentration auf die Strictosidin-Synthase-Aktivität III

EADIE und SCATCHARD. Während für Enzyme mit normaler MICHAELIS-MENTEN-Kinetik eine Gerade ermittelt wird, die die Abszisse bei dem Wert 1 schneidet, durchläuft die in Abbildung 16 exemplarisch für die Strictosidin-Synthase III dargestellte Kurve ein Maximum. Die quantitative Auswertung des Kooperativitätsgrades ist in der Auftragung nach HILL möglich und in Abbildung 17 für die Aktivität III wiedergegeben. Die errechneten HILL-Koeffizienten liegen zwischen $n_H = 1.3$ (Enzym I) und $n_H = 2.2$ (Enzym III). Tabelle 3 gibt eine Zusammenfassung der Resultate. Ein K_m -Wert konnte für Secologanin nicht verlässlich bestimmt werden. Zum einen war eine Sättigung der Strictosidin-Synthase mit Tryptamin aufgrund der Hemmung bei höheren Konzentrationen nicht

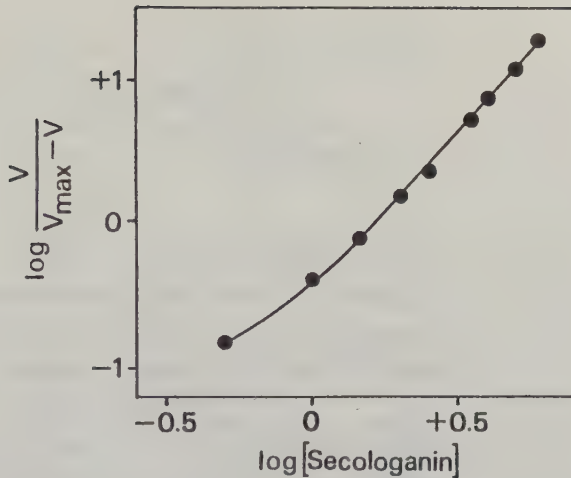
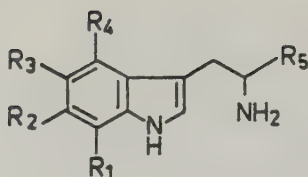


Abb. 17: Abhängigkeit der Strictosidin-Synthase-Aktivität III von der Secologaninkonzentration in der Auftragung nach HILL
 $n_H = 2.2$

möglich, zum anderen ändert sich die Affinität eines Enzyms bei vorliegender positiver Kooperativität mit variierender Substratmenge (AHLERS et al., 1982).

Genauso wie das Auftreten multipler Enzymformen steht das beobachtete kinetische Verhalten der Strictosidin-Synthase im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen. Sowohl MIZUKAMI et al. (1979) als auch TREIMER und ZENK (1979 b) hatten für die Secologaninabhängigkeit eine normale MICHAELIS-MENTEN-Kinetik der Strictosidinbildung beschrieben.



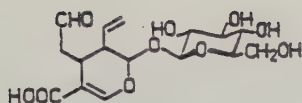
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃
-H	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H
-H	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H
-CH ₃	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃
-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	-CH ₃
-CH ₃	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃
-H	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₃

Abb. 18: Substratspezifität der Strictosidin-Synthase-Enzyme, eingesetzte Tryptaminderivate

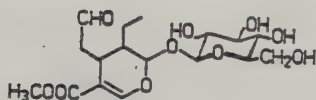
2.4. Substratspezifität

In Ergänzung der bekannten Arbeiten wurde die Substratspezifität der Strictosidin-Synthase mit den in Abbildung 18 aufgelisteten Tryptaminderivaten bestimmt. Dazu wurden jeweils 30 µkat einer angereicherten Enzympräparation (III.1.3.), die noch sämtliche Proteinformen enthielt, mit [7-³H]Secologanin und der zu testenden Substanz inkubiert und anschließend ein Aliquot dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt (II.5.2.).

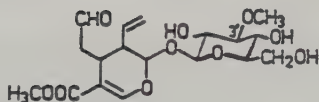
Während Tryptamin schon nach 2 stündiger Reaktionszeit vollständig metabolisiert war, wurde keines der substituierten Amine von der Strictosidin-Synthase als Sub-



Secologaninsäure



Dihydrosecologanin



3'-O-Methylsecologanin

Abb. 19: Substratspezifität der Strictosidin-Synthase-Enzyme, eingesetzte Secologaninderivate

strat akzeptiert. Dies vervollständigt die von TREIMER und ZENK (1979 b) publizierten Daten, nach denen nur in 5- oder 6-Stellung fluorierte oder hydroxylierte Moleküle und 7-Methyltryptamin, allerdings mit sehr viel langsamerer Geschwindigkeit (maximal 15%) von dem Enzym umgesetzt wurden. Die Bildung entsprechender Strictosidinderivate aus 1'- oder mehrfach substituierten Verbindungen konnte nicht gezeigt werden.

Die Spezifität der Strictosidin-Synthase für das Monoterpensubstrat wurde mit den in Abbildung 19 wiedergegebenen Verbindungen im Standardenzymtest mit einer partiell angereicherten Enzymlösung (III.1.3., jeweils 16.3 pkat Strictosidin-Synthase-Aktivität) überprüft. Secologaninsäure wurde dabei nicht metabolisiert. Ab-

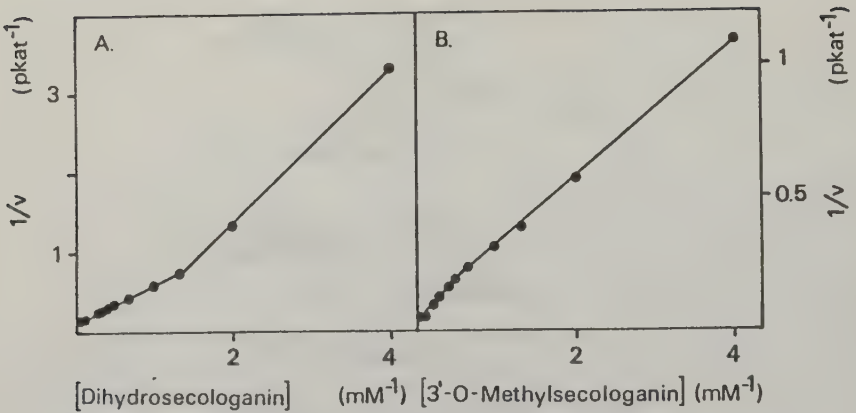


Abb. 20: Abhängigkeit der Strictosidin-Synthese-Reaktion von der Dihydrosecologaninkonzentration (A.) und der 3'-O-Methylsecologaninkonzentration (B.; $K_m = 3.6$ mM, $V_{max} = 14.3$ pkat) im LINEWEAVER-BURK-Diagramm. Je 16.3 pkat Strictosidin-Synthase-Aktivität wurden unter Standardbedingungen mit variierenden Substratmengen (0.25 mM - 25.0 mM) inkubiert.

Abbildung 20 zeigt die für die übrigen Substanzen ermittelten Ergebnisse in der doppelt reziproken Auftragung nach LINEWEAVER und BURK. Während die Abhängigkeit von der 3'-O-Methylsecologaninkonzentration eine normale MICHAELIS-MENTEN-Kinetik mit nur leicht ausgeprägter negativer Kooperativität bei höheren Substratmengen aufwies, ergab sich für Dihydrosecologanin ein positiver kooperativer Effekt, wie er auch mit Secologanin bereits gemessen wurde. Der K_m -Wert für das methylierte Substrat beträgt 3.6 mM bei einer Maximalgeschwindigkeit von 14.3 pkat.

2.5. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Strictosidin-Synthase wurde durch Gelfiltration des konzentrierten Rohextraktes (II.11.1.) und durch SDS-Gelelektrophorese (II.11.2.) homogener Proteinpräparationen bestimmt.

Mit keiner der beiden Methoden konnte eine Auftrennung der multiplen Enzymformen in Spezies unterschiedlicher Größe erzielt werden. Die Messung der Aktivitätsverteilung nach Gelchromatographie ergab ein völlig symmetrisches Elutionsprofil mit einem deutlich ausgeprägten Maximum. Auch auf SDS-Gelen wurde nur eine einzige, undifferenzierte Bande mit Coomassie Brilliant Blue anfärbt, wenn die Strictosidin-Synthase II (III.1.4.) nach Abtrennung der Verunreinigungen bei niedrigen R_f -Werten zusammen mit homogenem Enzym III auf ein Gel aufgetragen wurde. In Abbildung 11 war bereits gezeigt worden, daß die Aktivität II noch 2 Proteine enthielt, die durch dieselben chromatographischen Schritte angereichert wurden. Das Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese verstärkte daher die Vermutung, die Heterogenität der Strictosidin-Synthase könnte möglicherweise größer sein als die zunächst durch Chromatofokussierung aufgelösten 4 Enzymaktivitäten nahelegten. Die ermittelten Eichgeraden sind in Abbildung 21 dargestellt.

Das durch Gelfiltration bestimmte apparente Molekulargewicht beträgt 31 000 Dalton $\pm$ 10% und entspricht damit innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen dem von TREIMER und ZENK (1979 b) angegebenen Wert. Die SDS-Gelelektrophorese lieferte mit 41 500 Dalton $\pm$ 5% für homogene Strictosidin-Synthase III als Mittelwert aus 4 Bestimmungen jedoch ein abweichendes Resultat.

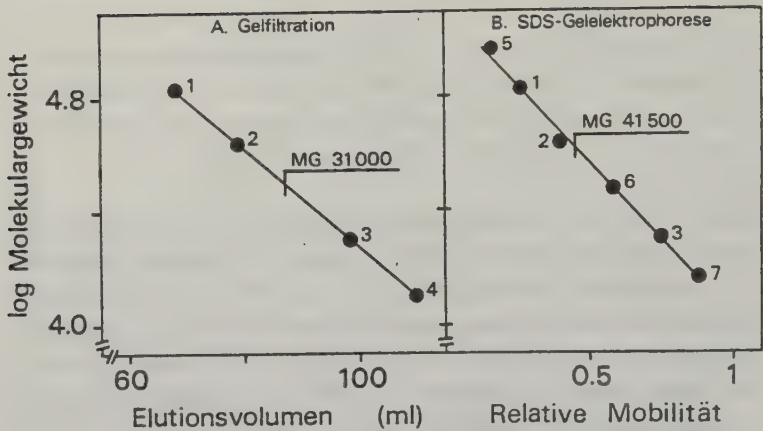


Abb. 21: Molekulargewichtsbestimmung der Strictosidin-Synthase durch Gelfiltration (A.) und SDS-Gelelektrophorese (B.)

1: Rinderserumalbumin	MG 67 000
2: Ovalbumin	MG 43 000
3: Trypsininhibitor (Sojabohne)	MG 20 100
4: Cytochrom c	MG 12 500
5: Phosphorylase b	MG 94 000
6: Carboanhydrase	MG 30 000
7: α -Lactalbumin	MG 14 400

2.6. Hemmstoffversuche zum Enzymmechanismus

Untersuchungen zum Katalysemechanismus der Strictosidin-Synthase sind bisher nur von TREIMER und ZENK (1979 b) durchgeführt worden. Die Autoren vermuteten, daß Tryptamin unter Beteiligung von Pyridoxalphosphat auf die Aldehydfunktion des Secologanins übertragen wird. Die Anwesenheit dieses Cosubstrates hatte jedoch keinen Einfluß auf die Enzymreaktion. Die im folgenden vorgestellten Experimente greifen diese Idee eines kovalent gebundenen Zwischenproduktes noch einmal auf. Unabhängig von Pyridoxalphosphat könnte Tryptamin dabei an einer anderen prosthetischen Carbonylfunktion oder Secologanin an der ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysinrestes im

aktiven Zentrum der Strictosidin-Synthase fixiert werden. Solche Umsetzungen unter intermediärer Ausbildung einer SCHIFF'schen Base sind in der Literatur z.B. beschrieben für die Histidin-Decarboxylase aus Lactobacillus (RECSEI und SNELL, 1970), für die Acetoacetat-Decarboxylase aus Clostridium acetobutylicum (WARREN et al., 1966) und für die δ -Aminolävulinat-Dehydratase aus Rhodopseudomonas spheroides (NANDI und SHEMIN, 1968) und dienten als Anregung bei der Konzeption der Experimente. Alle Versuche wurden mit homogener Strictosidin-Synthase III durchgeführt und auf Ansätze ohne Hemmstoffzugabe bezogen, die aber sonst gleich behandelt worden waren. Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Die Reduktion der Strictosidin-Synthase mit NaBH_4 führte nur zu einem partiellen Aktivitätsverlust, ebenso die Reduktion in Anwesenheit eines Überschusses an Tryptamin. Beide Experimente schließen die Bindung dieses Substrates an eine Carbonylgruppe im aktiven Zentrum aus. Auch durch Auszählen der dialysierten Proteinlösung nach Inkubation mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ Tryptamin und anschließender NaBH_4 -Reduktion konnte keine radioaktive Markierung der Strictosidin-Synthase nachgewiesen werden.

Die Beteiligung einer Aminogruppe an der Katalyse erscheint ebenfalls unwahrscheinlich. Alle Versuche zur Derivatisierung des aktiven Zentrums durch Secologanin oder $[7\text{-}^3\text{H}]$ Secologanin und NaBH_4 blieben erfolglos. 2,4-Pentandion, das in Anlehnung an GILBERT und O'LEARY (1975) zusätzlich zur selektiven Modifizierung von Lysinresten eingesetzt wurde, bewirkte ebenfalls keine signifikante Inhibierung der Umsatzgeschwindigkeit.

Hemmstoff	Enzymaktivität (%)
NaBH ₄	58
Tryptamin + NaBH ₄	63
Secologanin + NaBH ₄	93
2,4-Pentandion	96
Diäthylpyrocarbonat	2
Tryptamin + Diäthylpyrocarbonat	2
Secologanin + Diäthylpyrocarbonat	68
pH 8.5	18
NH ₂ OH·HCl pH 8.5	1
Tryptamin + NH ₂ OH·HCl pH 8.5	3
Secologanin + NH ₂ OH·HCl pH 8.5	38

Tab. 4: Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf die Strictosidin-Synthase-Aktivität

Alle ermittelten Umsatzraten wurden auf Ansätze ohne Hemmstoffzugabe, die aber sonst gleich behandelt worden waren, bezogen.

NaBH₄-Reduktion: Je 2.6 µg Strictosidin-Synthase wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur in Gegenwart von 45 nMol Tryptamin, 55 nMol Secologanin oder ohne Zusatz der Substrate inkubiert und anschließend mit festem NaBH₄ reduziert. Jeweils ein Aliquot wurde zur Bestimmung der verbliebenen Strictosidin-Synthase-Aktivität in den Standardtest eingesetzt.

2,4-Pentandion: 26.3 µg Strictosidin-Synthase wurden mit 4 µMol 2,4-Pentandion 6 h bei Raumtemperatur in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 inkubiert. Nach der Dialyse gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 wurde jeweils ein Aliquot zur Bestimmung der Strictosidin-Synthase-Aktivität im Standardtest eingesetzt.

Diäthylpyrocarbonat: Jeweils 0.3 µg Strictosidin-Synthase wurden in Anwesenheit von 90 nMol Tryptamin, 600 nMol Secologanin oder ohne Substratzugabe 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diese Ansätze wurden je 10 nMol Diäthylpyrocarbonat in 10% Äthanol gegeben. Nach 1 stündiger In-

kubation bei 4°C wurde die verbliebene Strictosidin-Synthase-Aktivität im Standardtest bestimmt.

NH₂OH·HCl: Jeweils 6.5 µg Strictosidin-Synthase wurden zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 0.8 µMol Tryptamin oder 1.2 µMol Secologanin bzw. ohne Zusatz inkubiert und 75 µMol NH₂OH·HCl pH 8.5 zugegeben. Die Ansätze wurden 24 h bei Raumtemperatur stehengelassen und danach zur Abtrennung des Hemmstoffes gegen 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 dialysiert. Für die Messung der Strictosidin-Synthase-Aktivität wurde jeweils ein Aliquot in den Standardenzymtest eingesetzt.

Als potenter Hemmstoff erwies sich jedoch Diäthylpyrocarbonat. Dieses Reagenz ist bezüglich seines Angriffsortes allerdings nicht sehr spezifisch und führt zur Derivatisierung von Lysin, Arginin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Cystein (VALLEE und RIORDAN, 1969). Um die Wirkungsweise auf die Strictosidin-Synthase einschränken zu können, wurde eine von WILSON MILES (1977) vorgeschlagene Inkubation mit Hydroxylamin zur selektiven Decarboxylierung von modifizierten Histidin- oder Tyrosinresten durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß diese Substanz ebenfalls eine starke Hemmung der Enzymaktivität verursacht.

Eine Klärung des Katalysemechanismus der Strictosidin-Synthase konnten die geschilderten Experimente somit nicht erbringen. Allerdings zeigte sich in allen Fällen eine weniger stark ausgeprägte Inhibierung der Enzymaktivität, wenn die Proteinklösung vor der Hemmstoffzugabe mit Secologanin äquilibriert wurde (Tabelle 4). Das könnte jedoch auf die Reaktion der getesteten Verbindungen mit der Aldehydfunktion oder den Hydroxylgruppen des Substrates an Stelle der Aminosäureseitenketten des Proteins zurückzuführen sein. Wurde die Strictosidin-Synthase im Alkalischen bei pH 8.5 mit Secologanin

inkubiert, so wurde aber ebenfalls trotz gleichzeitiger Anwesenheit eines hohen Überschusses von $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ein deutlich geringerer Aktivitätsverlust gemessen. Dies kann nur so interpretiert werden, daß das Substrat möglicherweise nicht nur vor der Hemmstoffeinwirkung schützt, sondern auch eine Inaktivierung der Strictosidin-Synthase unter denaturierenden Bedingungen verhindert. Die Stabilisierung eines Enzyms in Gegenwart seiner Substrate ist ein häufig beobachtetes Phänomen, welches schon 1890 von O'SULLIVAN und TOMPSON für die Invertase aus Hefe beschrieben wurde. Bestätigt werden konnte dieser Effekt hier durch eine signifikant verringerte Hitzeinaktivierung der Strictosidin-Synthase, wenn das Enzym 10 Minuten bei 46°C zusammen mit Secologanin inkubiert wurde.

3. Antikörper gegen die Strictosidin-Synthase

Weiterführende Möglichkeiten zur Charakterisierung eines Enzyms eröffnen sich mit der Erzeugung von Immunglobulinen, die gegen dieses Protein gerichtet sind. Wird dabei die klassische Gewinnung polyklonaler Antikörper angestrebt, so sind homogene Proteinpräparationen die sicherste Voraussetzung zur Isolation monospezifischer γ -Globuline. Diese Bedingung schien zwar für die Strictosidin-Synthase III erfüllt, jedoch ergaben sich wesentliche Komplikationen durch die neu entdeckte Multiplizität des Enzyms. Zum einen war das genaue Ausmaß der Heterogenität unsicher, zum anderen waren molekulare, und damit auch mögliche immunogene Unterschiede der multiplen Formen nicht bekannt. Die Erzeugung von Antikörpern sowohl gegen einzeln isolierte Enzymaktivitäten als auch gegen ein Gemisch aller Strictosidin-Synthase-Proteine sollte daher ein Ansatzpunkt zur Klärung dieser Problematik sein.

3.1. Antikörper gegen partiell gereinigte Strictosidin-Synthase-Enzyme

Zur Induktion von Antikörpern gegen sämtliche Enzymformen war es zunächst notwendig, ein abgeändertes Reinigungsschema auszuarbeiten. Es sollte dabei eine Auftrennung der Strictosidin-Synthase-Proteine möglichst vermieden werden, damit auch Enzymspezies mit geringster Aktivität nicht während der Aufarbeitung verloren gingen.

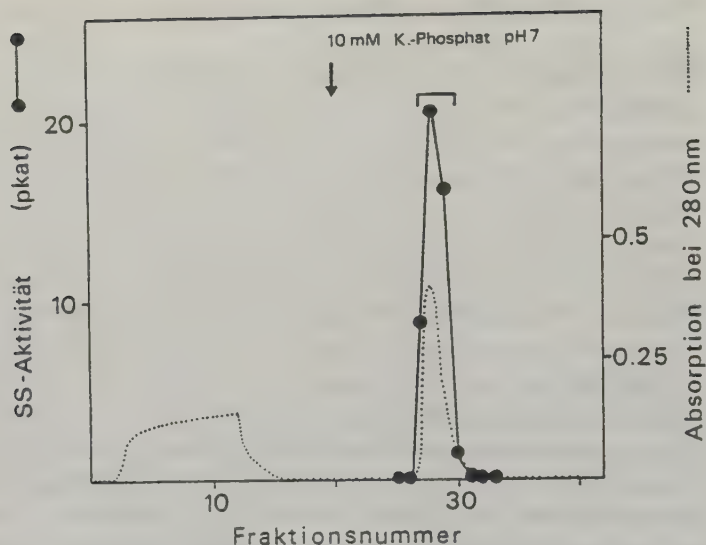


Abb. 22: Chromatographie der Strictosidin-Synthase an Matrex Gel Blue A
Die Elutionsbedingungen sind im Methodenteil (II.9.2.) erläutert.

3.1.1. Reinigung der Strictosidin-Synthase

Ein Proteinrohextrakt wurde aus 1 kg eingefrorenem C. roseus Zellgewebe hergestellt (II.8.2.) und durch Ammoniumsulfatfraktionierung (35 - 50%), Gelfiltration (II.9.1.) und hydrophobe Chromatographie (II.9.2.) angereichert. Der aktive Durchlauf durch die Matrex Gel Red A Säule wurde vereinigt und über Nacht gegen 10 Liter 25 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 4.5 dialysiert. Ausgefallene Proteine wurden durch Sedimentation abgetrennt, der klare Überstand unter ständigem Rühren portionsweise mit festem Ammoniumsulfat bis zu 25% iger Sättigung versetzt und anschließend auf die voräquili-brierte Matrex Gel Blue A Säule gepumpt (II.9.2.). Unter

den gewählten Bedingungen wurde die Strictosidin-Synthase Aktivität vollständig an der hydrophoben Matrix zurückgehalten (Abbildung 22). Die Desorption erfolgte durch Waschen mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7. Die Fraktionen 27 - 30 (6 ml) wurden vereinigt, gegen 5 l 10 mM Natrium-Kaliumphosphat-Puffer pH 7.4 dialysiert und durch Ultrafiltration konzentriert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Reinigung.

Die Strictosidin-Synthase-Enzyme wurden auf diese Weise 500 fach bei einer spezifischen Aktivität von 46.4 nkat/mg Protein angereichert. Nach Auftrennung der Präparation auf Polyacrylamidgelen (DAVIS, 1964) wurden im Bereich der Strictosidin-Synthase-Aktivität mindestens 5 diskrete Proteinbanden mit Amidoschwarz angefärbt (Abbildung 23). Eine eindeutige Klärung, ob es sich bei allen Banden um Strictosidin-Synthase-Enzyme handelte, war nicht möglich. Daher wurde die Präparation ohne weitere Reinigung zur Immunisierung von 2 Kaninchen verwendet, obwohl sie mit Sicherheit noch Fremdproteine enthielt.

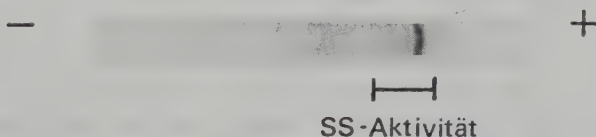


Abb. 23: Polyacrylamidgelelektrophorese partiell angereicherter Strictosidin-Synthase-Formen (spez. Akt. 46.4 nkat/mg Protein) nach DAVIS (1964)
Zur Anfärbung mit Amidoschwarz wurden 26 μ g Protein pro Gel aufgetragen, zur Lokalisation der Strictosidin-Synthase 243 pkat Enzymaktivität.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicher. (x-fach)
Rohextrakt	2430	2781	259.1	0.09	100	1
Ammoniumsulfat- fraktionierung (35-50%), Dialyse	86	1466	257.9	0.18	100	2
Gelfiltration an ACA 44, Ultrafil- tration	8.2	165	254.7	1.5	98	17
Hydrophobe Chro- matographie an Ma- trex Gel Red A	24.0	30.3	253.9	8.4	98	93
Hydrophobe Chro- matographie an Ma- trex Gel Blue A, Ultrafiltration	2.2	2.3	107.0	46.4	41	516

Tab. 5: Anreicherung der Strictosidin-Synthese aus 1 kg (FG) C. roseus Zellgewebe

3.1.2. Charakterisierung des Antiserums

Die Tiere wurden 4 mal mit je 0.105 mg Protein in PBS vorimmunisiert und bekamen anschließend in 4 wöchigem Abstand Boosterinjektionen zu 0.210 mg Protein (II.13.). Die Induktion spezifischer Immunglobuline konnte mit 2 unterschiedlichen Testmethoden gezeigt werden.

Mit Erhalt der ersten Blutfraktionen wurde zunächst überprüft, ob gegen die Strictosidin-Synthase gebildete Antikörper durch eine Beeinflussung der Enzymaktivität nachgewiesen werden können. Dazu wurden 29 μ kat einer angereicherten Präparation (III.1.3.) mit jeweils 50 μ l Serum versetzt, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zentrifugation der Ansätze ein Aliquot des Überstandes im Standardenzymtest auf Strictosidin-Synthase-Aktivität gemessen.

Nur die Seren der beiden mit gereinigten C. roseus Proteinen gespritzten Kaninchen bewirkten eine deutliche Unterdrückung der Enzymaktivität, während die Inkubation mit einer Serumfraktion von Kontrolltieren (Immungen BSA) keine signifikante Inhibierung hervorrief. Diese Tatsache wurde zur Ausarbeitung eines einfachen Standardtestes (II.14.1.) genutzt, der zur quantitativen Abschätzung des Antikörpergehaltes aller folgenden Seren herangezogen wurde. Abbildung 24 zeigt als Anwendungsbeispiel den zeitlichen Verlauf der Immunantwort eines ausgewählten Kaninchens.

Die qualitative Untersuchung gereinigter γ -Globulin-Fractionen (II.14.2.) erfolgte durch Immunelektrophorese (II.14.3.). In Abbildung 25 sind die Photographien der angefärbten Glasplatten wiedergegeben.

In Übereinstimmung mit dem Inhibierungstest konnten Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline nur im Serum

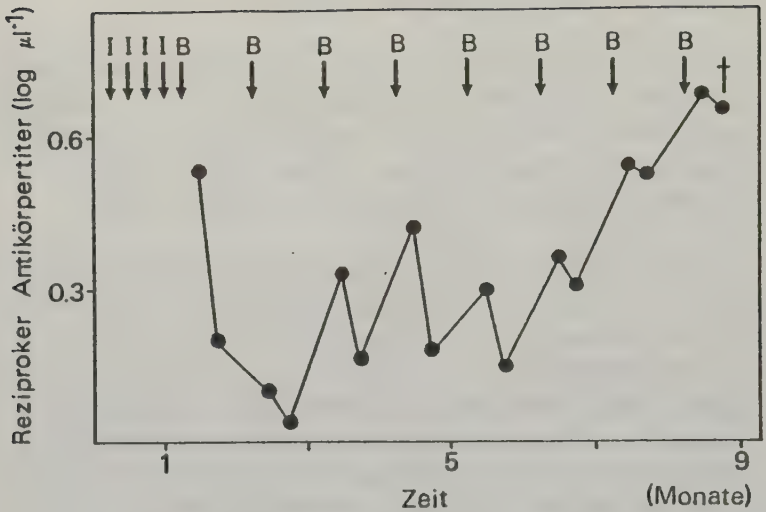


Abb. 24: Änderung des Antikörpertiters während der Immunisierung eines Kaninchens
 I: Vorimmunisierung (0.105 mg Protein)
 B: Boosterinjektion (0.210 mg Protein)

solcher Kaninchen nachgewiesen werden, die auch mit der isolierten Enzympräparation behandelt worden waren. Eine Immunreaktion zeigte sich dabei sowohl mit der Strictosidin-Synthase-Aktivität II als auch mit Enzym III. Allerdings enthielten die Antiseren beider Tiere darüberhinaus mindestens 2 Antikörperpopulationen, die gegen Fremdproteine gerichtet waren und für jede weitere Nutzung dieser Blutfraktionen zunächst aus der Lösung entfernt werden mußten.

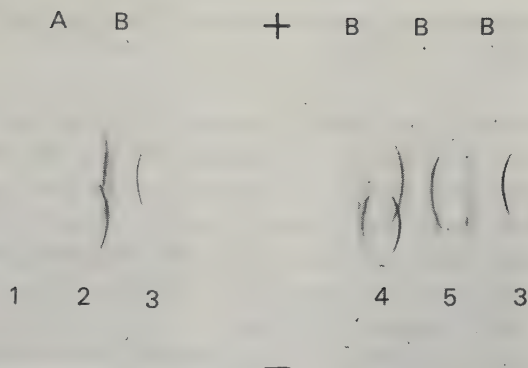


Abb. 25: Nachweis Strictosidin-Synthase-spezifischer Antikörper durch Immunelektrophorese
 1: 5 μ l 0.01% Bromphenolblaulösung
 2: 4.9 μ g partiell angereicherte Strictosidin-Synthase-Enzyme (III.3.1.1., spez. Akt. 46.4 nkat/mg)
 3: 0.4 μ g homogene Strictosidin-Synthase III (III.1.5., spez. Akt. 104.7 nkat/mg)
 4: 1.6 μ g partiell angereicherte Strictosidin-Synthase III (III.1.4., spez. Akt. 68.2 nkat/mg)
 5: 0.9 μ g partiell angereicherte Strictosidin-Synthase II (III.1.4., spez. Akt. 43.7 nkat/mg)
 A: 0.1 ml Immunglobulinfraktion aus Serum von Kontrolltieren
 B: 0.1 ml Immunglobulinfraktion aus Serum Strictosidin-Synthase-immunisierter Tiere

3.1.3. Reinigung des Antiserums durch Affinitätschromatographie

Zur Reinigung eines Antiserums können entweder die kontaminierenden oder die gesuchten Antikörper aus dem IgG-Anteil durch Adsorption entfernt werden. Da das mit partiell angereicherten Strictosidin-Synthase-Enzymen ausgebildete Präzipitationsmuster jedoch ziem-

lich komplex erschien (s. Abbildung 25, Brunnen 2), wurde hier nur nach einer Möglichkeit gesucht, die Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline selbst zu isolieren.

Prinzipiell sind dazu homogene Enzymlösungen nicht notwendig, wenn bei Anwendung anderer Proteinreinigungsmethoden die Abtrennung der Fremdan Antigene erzielt werden kann. Andererseits enthielt aber die hochangereicherte Strictosidin-Synthase III nach Chromatofokussierung noch ein zweites, immunreaktives Protein (s. Abbildung 25, Brunnen 4). Zur Gewinnung genügend reiner Enzympräparationen wurde daher eine weitere Variante der Strictosidin-Synthase-Isolation gesucht. Da die kontaminierenden Proteine im Vergleich zu der Strictosidin-Synthase in der Agaroseelektrophorese langsamer in Richtung Anode wanderten, sollten sie eine geringere Ladungsdichte aufweisen und daher durch Chromatographie an DEAE-Cellulose abgetrennt werden. Im folgenden wird eine Reinigung unter Anwendung dieses Schrittes beschrieben.

Ein Proteinrohextrakt (II.8.2.) aus 1 kg gefrorenem C. roseus Gewebe wurde durch fraktioniertes Aussalzen (35 - 50% Ammoniumsulfat) konzentriert und durch Gel-filtration (II.9.1.) angereichert. Aktive Fraktionen wurden durch Ultrafiltration eingengt und nach Dialyse gegen 10 Liter 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8.0 auf eine äquilibrierte DEAE-Cellulose Säule gegeben (II.9.4.). Die bei KCl-Konzentrationen von 220 mM - 320 mM eluierte Strictosidin-Synthase-Aktivität aus 7 Aufarbeitungen wurde gesammelt, eingengt und anschließend durch Chromatofokussierung (II.9.3.) weitergereinigt. Tabelle 6 faßt alle Schritte zusammen.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicher. (x-fach)
Rohextrakt	18 783	18 013	1191	0.07	100	1
Ammoniumsulfat- fraktionierung (35-50%), Dialyse	546	5 501	1133	0.21	95	3
Gelfiltration an ACA 44, Ultrafil- tration	51.8	588	1088	1.9	91	27
Ionenaustauscher- chromatographie an DEAE-Cellulose DE 52, Ultrafil- tration	33.9	25.1	419.2	16.7	35	239
Chromatofokussie- rung an PBE 94						
Enzym II	13.9	0.89	86.8	97.4	7	1391
Enzym III	16.2	1.32	135.8	102.9	11	1470

Tab. 6: Anreicherung der Strictosidin-Synthase aus 7 kg (FG) C. roseus Zellgewebe

Durch diese Prozedur wurden bevorzugt die Strictosidin-Synthase-Aktivitäten II und III isoliert. Die elektrophoretische Auftrennung von Enzym II auf Polyacrylamidgelen (DAVIS, 1964) ergab dasselbe Muster einer schwächer und einer stärker angefärbten Proteinbande bei R_f -Werten zwischen 0.65 und 0.71, wie es bereits in Abbildung 11 dargestellt wurde. Beide Präparationen wiesen nur noch geringfügige Verunreinigungen auf. Ihre Eignung zur Adsorption der Strictosidin-Synthase-Antikörper wurde in der Immunelektrophorese und im OUCHTERLONY-Test überprüft (Abbildungen 26 und 27).

Nach der Diffusion gegen die kontaminierte γ -Globulin-Fraktion bildete sich jeweils nur noch 1 Präzipitatbogen aus. Im Doppeldiffusionstest zeigte sich darüberhinaus eine Reaktion vollständiger Identität, d.h. Enzym II und Enzym III werden von denselben Antikörperpopulationen erkannt. Es wurde daher im folgenden der Versuch unternommen, alle Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline durch Affinitätschromatographie über diese beiden Enzymaktivitäten zu isolieren.

Die beiden Präparationen wurden vereinigt, 5 mg BSA als Trägerprotein zugesetzt und Ammoniumsulfat bis zu 100% iger Sättigung in die Lösung gegeben. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation gesammelt und nach Dialyse gegen 0.1 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl an 0.5 g CNBr-aktivierte, quervernetzte Agarose gebunden (II.15.). 97% des eingesetzten Proteins wurden dabei an der Matrix immobilisiert. In Vorversuchen sollten daraufhin zunächst die günstigsten Bedingungen zur Desorption der Strictosidin-Synthase-Antikörper ermittelt werden.

Je ein Aliquot des immobilisierten Enzyms wurde mit der angereinigten IgG-Fraktion (II.14.2.) inkubiert, adsorbierte Antikörper durch Zentrifugation zusammen mit

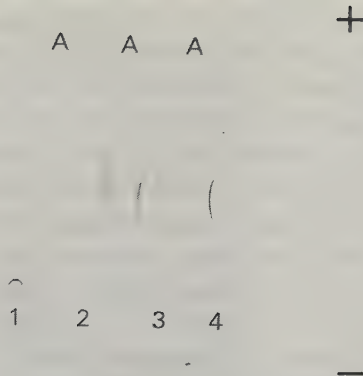


Abb. 26: Immunelektrophorese unter Verwendung hochangereicherter Strictosidin-Synthase-Enzyme und einer kontaminierten Immunglobulinfraktion
 1: 5 μ l 0.01% Bromphenolblaulösung
 2: 2.5 μ g Strictosidin-Synthase III (III.3.1.3., spez. Akt. 102.9 nkat/mg)
 3: 1.8 μ g Strictosidin-Synthase II (III.3.1.3., spez. Akt. 97.4 nkat/mg)
 4: 0.4 μ g homogene Strictosidin-Synthase III (III.1.5., spez. Akt. 104.7 nkat/mg)
 A: 0.1 ml kontaminierte Immunglobulinfraktion (III.3.1.2.)



Abb. 27: Doppelldiffusionstest nach OUCHTERLONY
 1: 0.7 μ g Strictosidin-Synthase II (III.3.1.3., spez. Akt. 97.4 nkat/mg)
 2: 1.0 μ g Strictosidin-Synthase III (III.3.1.3., spez. Akt. 102.9 nkat/mg)
 A: 60 μ l kontaminierte Immunglobulinfraktion (III.3.1.2.)

dem Gel sedimentiert und der Niederschlag mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zu dem Gel unterschiedliche, aus der Literatur bekannte Desorbentien gegeben und nach 1 stündiger Inkubation unter ständigem Schütteln die Überstände zur Dialyse gegen PBS abgehoben. Die Ausbeute an aktiven γ -Globulinen wurde in dem unter II.14.1. erläuterten Standardtest durch Hemmung der Strictosidin-Synthase-Aktivität bestimmt. Saurer pH-Wert und denaturierende Agentien zeigten dabei die größte Effizienz (Tabelle 7).

Für die präparative Isolation spezifischer γ -Globuline wurde das Strictosidin-Synthase-Gel in eine Säule gefüllt (1 x 2.5 cm), die IgG-Fraktion bei einer Flussrate von 10 ml/h bis zur Absättigung aller Bindungsstellen darübergepumpt und nicht gebundenes Protein durch PBS ausgewaschen. Die Desorption erfolgte mit 1 ml 6 M Guanidin-HCl pH 7. Das denaturierende Agens wurde direkt nach der Passage der Strictosidin-Synthase-Matrix mittels einer am Auslauf angeschlossenen Sephadex G-25 Säule (1 x 18 cm) von der Proteinfraction abgetrennt.

Das Eluat enthielt Antikörper, mit denen eine vollständige Unterdrückung der Enzymaktivität aller Strictosidin-Synthase-Formen gemessen wurde. Im Durchschnitt wurden 2.3 mg spezifische Immunglobuline aus 10 ml Serum bei einer Aktivitätsausbeute von 45% isoliert. Die immunoelektrophoretische Analyse zeigte nach Diffusion gegen die zur Immunisierung verwendete, partiell angereicherte Enzympräparation nur noch einen Präzipitationsbogen (Abbildung 28).

Desorptionsagens	Ausbeute an aktiven Strictosidin-Synthase-Antikörpern (%)
3 M NaCl pH 6.0	0
3 M NaCl, NH_4OH , pH 10.3	27
3 M NaCl, Citronensäure, pH 2.5	43
3 M MgCl_2 pH 4.1	0
3 M NaJ pH 5.9	24
3 M NH_4SCN pH 4.8	35
8 M Harnstoff pH 7.4	43
6 M Guanidin-HCl pH 7	47
10% Dioxan	16
50% Äthylenglykol	19

Tab. 7: Desorption der Strictosidin-Synthase-Antikörper nach Bindung an immobilisiertes Enzym durch unterschiedliche Agentien
Die Ausbeute an aktiven Immunglobulinen wurde durch Hemmung der Strictosidin-Synthase-Enzymaktivität (II.14.1.) bestimmt.

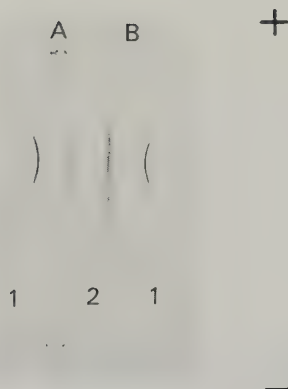


Abb. 28: Immunelektrophoretische Analyse der durch Affinitätschromatographie gereinigten γ -Globulinfraktion

- 1: 0.4 μ g homogene Strictosidin-Synthase III (III.1.5., spez. Akt. 104.7 nkat/mg)
- 2: 4.9 μ g partiell angereicherte Strictosidin-Synthase-Enzyme (III.3.1.1., spez. Akt. 46.4 nkat/mg)
- A: 0.1 ml affinitätsgereinigte Immunglobulinfraktion
- B: 0.1 ml kontaminierte Immunglobulinfraktion

3.2. Charakterisierung von Antikörpern gegen homogene Strictosidin-Synthase

Die Experimente zur Analyse und Reinigung der Antikörper, die gegen alle Strictosidin-Synthase-Proteine gerichtet waren, hatten schon Hinweise auf eine immunologische Kreuzreaktion der multiplen Formen ergeben. Da eine präparative Methode zur Isolation eines einzelnen Enzymproteins (Enzym III) bereits ausgearbeitet war, konnte dies durch Gewinnung entsprechender Seren leicht überprüft werden. Antikörper wurden darüberhinaus auch gegen die Strictosidin-Synthase-Aktivität II er-

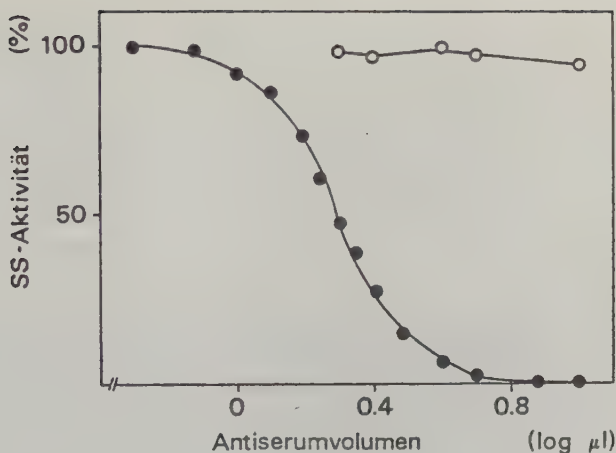


Abb. 29: Beeinflussung der Enzymaktivität multipler Strictosidin-Synthase-Proteine durch Anti-Strictosidin-Synthase III-Immunglobuline (●) und Kontrollserum (○). Jeweils 29 pkat Strictosidin-Synthase-Aktivität (III.1.3.) wurden mit 1 µl - 20 µl Serum 1 h bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 0.1 ml inkubiert. Nach Zentrifugation wurden 50 µl des Überstandes in den Standard-enzymtest eingesetzt.

zeugt. Die Anwendung unterschiedlicher Trennmethoden hatte jedesmal zur Anreicherung einer Proteinfraction geführt, die auf Polyacrylamidgelen nach DAVIS (1964) ein konstantes Anfärbungsmuster bei R_F -Werten von 0.65 - 0.71 zeigte. Es lag die Vermutung nahe, es könnte sich hierbei um 2 Strictosidin-Synthase-Proteine handeln. Zur Immunisierung eines Kaninchens wurden daher beide Proteinbanden gespritzt.

Die Enzyme II und III wurden nach Anreicherung durch Gelfiltration (II.9.1.), hydrophober Chromatographie an Matrex Gel Red A (II.9.2.) und Chromatofokussierung (II.9.3.) in der Elektrophorese nach DAVIS (1964,

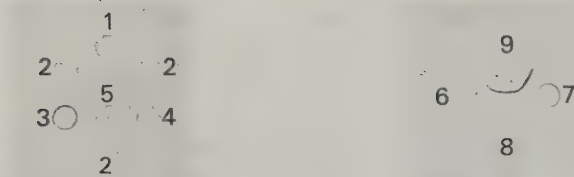


Abb. 30: Qualitative Analyse der gegen die Strictosidin-Synthase-Aktivität II erzeugten Immunglobuline auf ihre Reinheit und Kreuzreaktion

- 1: 6.4 μ g Enzym I nach Chromatofokussierung
- 2: 3.2 μ g Enzym II nach Chromatofokussierung
- 3: 2.3 μ g Enzym III nach Chromatofokussierung
- 4: 9.9 μ g Enzym IV nach Chromatofokussierung
- 5: 60 μ l Anti-Strictosidin-Synthase II-Immunglobulinfraktion
- 6: 49 μ g Protein einer 35 - 50% igen Ammoniumsulfatfällung
- 7: 197 μ g Protein einer 35 - 50% igen Ammoniumsulfatfällung
- 8: 0.9 μ g Enzym II nach Chromatofokussierung
- 9: 10 μ l Anti-Strictosidin-Synthase II-Immunglobulinfraktion

II.10.1.) von restlichen Verunreinigungen abgetrennt und mit PBS von der Polyacrylamidmatrix eluiert. Nach Dialyse der Enzymlösungen wurden die Tiere mit je 30 μ g Strictosidin-Synthase III oder 47 μ g Strictosidin-Synthase II vorimmunisiert und anschließend mit der doppelten Proteinmenge geboostert (II.13.). Die Analyse der gewonnenen Serumfraktionen wurde zunächst im Aktivitätshemmtest durchgeführt (II.14.1., Abbildung 29). Die spezifisch gegen die Strictosidin-Synthase II oder III erzeugten Antikörper bewirkten jeweils die völlige Unterdrückung der Enzymaktivität einer partiell angereicherten Präparation, die noch sämtliche multiplen Formen enthielt. Die qualitative Untersuchung der γ -Globulinfraktion im OUCHTERLONY-Test ist in Ab-

bildung 3o dargestellt.

In den Seren wurden ausschließlich gegen die Strictosidin-Synthase gerichtete Antikörper nachgewiesen. Dabei ergab sich sowohl für die Anti-Strictosidin-Synthase II- als auch für die Anti-Strictosidin-Synthase III-Immunglobuline mit allen übrigen Enzymaktivitäten eine Reaktion vollständiger Identität. Nach Diffusion von Strictosidin-Synthase II-Antikörpern gegen das gespritzte Enzym oder einen Rohextrakt wurde jeweils nur ein Präzipitatbogen ausgebildet. Die 2 isolierten Proteinbanden verursachen damit die Induktion derselben Antikörperpopulationen, sind also immunologisch identisch.

Die Experimente zur Gewinnung spezifischer Immunglobuline zeigten, daß alle Strictosidin-Synthase-Proteine gemeinsame antigene Determinanten haben. Hinweise auf Antikörper, die zwischen einzelnen Formen differenzieren können, ergaben sich nicht. Es wurden daher für alle folgenden Versuche Seren unterschiedlich immunisierter Kaninchen verwendet, ohne daß deren Herkunft ausdrücklich erwähnt wird.

4. Anwendung spezifischer Antikörper zur Isolation und Charakterisierung der Strictosidin-Synthase aus Zellkulturen und Pflanzen

Hochauflösende physikalische Trennmethoden hatten in dieser Arbeit erstmals die Präparation multipler Strictosidin-Synthase-Formen aus C. roseus Zellkulturen ermöglicht. Ihre Beschreibung blieb jedoch zunächst unzureichend. Bevorzugt wurden 2 Hauptaktivitäten isoliert, während die Enzyme I und IV höchstens partiell angereichert werden konnten und die Zuordnung von Proteinbanden auf Polyacrylamidgelen nie eindeutig gelang. Auch konnte die Heterogenität der Strictosidin-Synthase-Aktivität II erst durch immunologische Untersuchungen bewiesen werden. Die Verwendung spezifischer Antikörper schien daher geeignet, endgültige Klarheit über die Multiplizität des Enzyms zu gewinnen. Da die Kreuzreaktion aller Strictosidin-Synthase-Proteine bereits gezeigt worden war, sollte durch Ausarbeitung einer Immunadsorptionschromatographie die Voraussetzung für weiterführende biochemische und physiologische Untersuchungen zur Heterogenität des Enzyms geschaffen werden.

4.1. Immunadsorptionschromatographie der Strictosidin-Synthase aus C. roseus Zellkulturen

30.7 mg affinitätsgereinigte Immunglobuline (III.3.1.3.) wurden an 1.5 g CNBr-aktivierte, quervernetzte Agarose gekoppelt (II.15.). 98% des eingesetzten Proteins wurden dabei immobilisiert. Vorversuche zur Desorption der Strictosidin-Synthase von dem Antikörpergel wurden ähnlich, wie bereits unter III.3.1.3. für die Affinitätschromatographie unreiner Immunglobulinfraktionen beschrieben, durchgeführt. Auch hier wurde die höchste Ausbeute an aktivem Enzym bei Verwendung denaturieren-

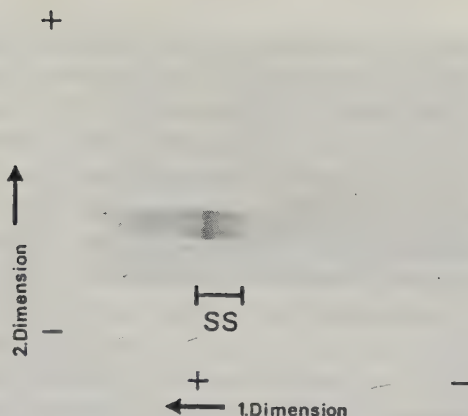


Abb. 31: Nachweis spezifischer und unspezifischer Proteinadsorption an einer mit Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobulinen besetzten Agarosematrix durch zweidimensionale Immunelektrophorese

Je 13.1 μg der eluierten Proteinfraction wurden auf Polyacrylamidgelen nach DAVIS (1964) aufgetrennt. Ein Gel wurde in Amidoschwarz angefärbt, ein zweites Gel wurde entsprechend der unter II.14.3.3. skizzierten Versuchsanordnung in ein Antikörper-haltiges Agarosegel elektrophoretisiert.

der Agentien erzielt. Zur präparativen Isolation der Strictosidin-Synthase wurde das Gel in eine Säule gepackt (1.5 x 3.5 cm), ein durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentrierter (35 - 50% Sättigung) Proteinrohextrakt in PBS bei einer Flußrate von 10 ml/h auf das äquilibrierte Gelbett gegeben und mit Puffer nachgewaschen. Nachdem im Säulendurchlauf kein Protein mehr nachzuweisen war, wurde adsorbiertes Material durch 1 ml 6 M Guanidin·HCl pH 7 eluiert. Die spezifische Aktivität der isolierten Strictosidin-Synthase-Präparation betrug 10 nkat/mg Protein. Dieser Wert ist auffällig niedriger als bei früher erzielten Ergebnissen. Die Reinheit und Immunreaktivität des Eluates wurden daher durch elektrophoretische Methoden überprüft (Abbildung 31).

Obwohl sich nach elektrophoretischer Auftrennung und Behandlung mit Amidoschwarz über die gesamte Länge eines Polyacrylamidgeles Proteinbanden anfärbten, ergab sich ein Immunpräzipitat bei der Elektrophorese dieser Proteine in ein Antikörper-haltiges Agarosegel nur auf Höhe der Strictosidin-Synthase-Enzymaktivität. Die Kontaminationen sind damit allein auf unspezifische Adsorption von lipophilen Proteinen an der Affinitätsmatrix zurückzuführen. Mehrere Versuche wurden anschließend unternommen, um eine solche Anlagerung von Fremdproteinen zu verhindern, z.B. durch eine vorgeschaltete Chromatographie an einem hydrophoben Gel oder durch die Zugabe von Polyklar AT ins Aufschlußmedium zur Entfernung von Phenolen. Am erfolgreichsten erwies sich jedoch die im folgenden beschriebene Prozedur.

Ein Rohextrakt (156.9 nkat Strictosidin-Synthase-Aktivität, spezifische Aktivität 0.07 nkat/mg Protein) wurde aus 1.5 kg C. roseus Zellen hergestellt, durch Ammoniumsulfatfällung (35 - 50%) konzentriert und die sedimentierten Proteine gegen H_2O (3 x 10 Liter) dialysiert. Anschließend wurde der Niederschlag, der sich während der Dialyse bildete, abzentrifugiert, ca. 1/5 des klaren Überstandes nach Zugabe von festem NaCl (Endkonzentration 0.5 M) auf das äquilibrierte Anti-Strictosidin-Synthase-Affinitätsgel gepumpt und mit 10 mM Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4, 0.5 M NaCl solange nachgewaschen, bis im Durchlauf kein UV-absorbierendes Material mehr nachgewiesen werden konnte. Unspezifisch gebundene Proteine wurden zum größten Teil durch 2 M Guanidin-HCl pH 7 desorbiert, während die Strictosidin-Synthase-Aktivität erst bei Zugabe von 1 ml 6 M Guanidin-HCl pH 7 eluiert wurde. Das denaturierende Agens wurde durch eine am Ausfluß angeschlossene Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25, 1 x 18 cm) sofort wieder von der Enzymlösung abge-

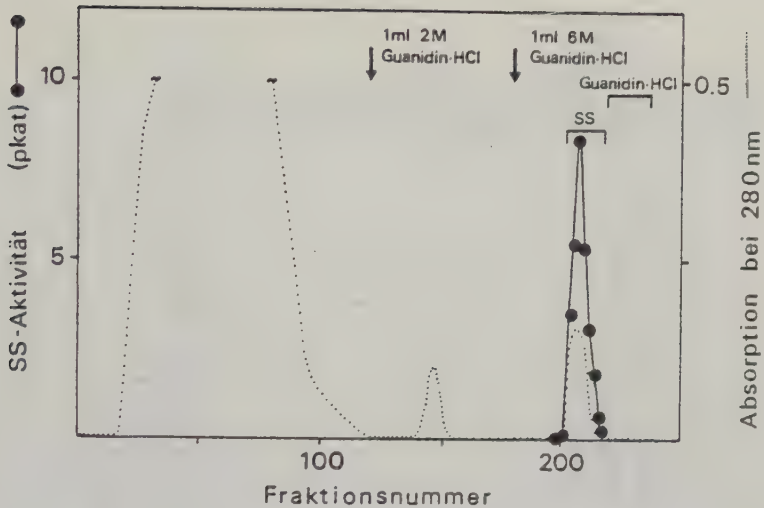


Abb. 32: Immunadsorptionschromatographie der Strictosidin-Synthase
Die Elutionsbedingungen sind dem Text zu entnehmen.

trennt. Aktive Fraktionen (Volumen je 0.5 ml) wurden vereinigt, über Nacht gegen 5 Liter H_2O dialysiert, klarzentrifugiert und bei $-20^{\circ}C$ in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 gelagert.

Aus dem angereicherten Rohextrakt wurde die Strictosidin-Synthase-Aktivität in 5 aufeinanderfolgenden Läufen vollständig adsorbiert. Abbildung 32 zeigt das Elutionsprofil, Tabelle 8 die quantitative Auswertung der Reinigung. Bei 25% iger Aktivitätsausbeute wurde eine Enzympräparation mit einer spezifischen Aktivität von 74.4 nkat/mg Protein gewonnen. Die analytische Reinheit und das Ausmaß der Heterogenität wurden durch Elektrophoresen überprüft. Abbildung 33 zeigt die Auftrennung auf Polyacrylamidgelen nach DAVIS (1964).

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicher. (x-fach)
Rohextrakt	3860	2271	156.9	0.07	100	1
Ammoniumsulfat- fraktionierung (35-50%), Dialyse	89.5	168	87.7	0.52	56	7
Immunadsorp- tionschromato- graphie, Dialyse	35.6	0.52	38.8	74.4	25	1063

Tab. 8: Anreicherung der Strictosidin-Synthase aus 1.5 kg (FG) C. roseus Zellgewebe
Die dialysierte Ammoniumsulfatfällung wurde in 5 Portionen über die Affinitäts-
matrix gegeben.

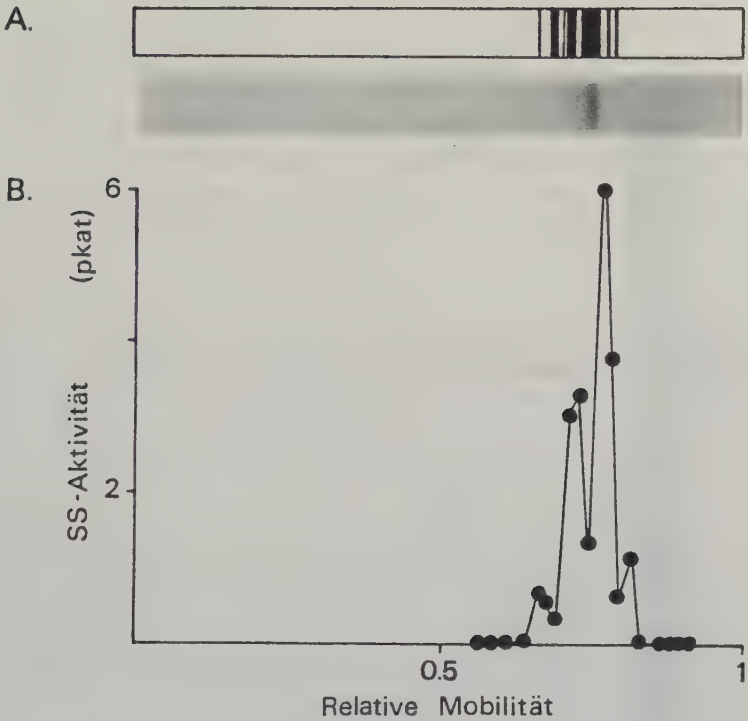


Abb. 33: Polyacrylamidgelelektrophorese (DAVIS, 1964) einer durch Immunadsorptionschromatographie angereicherten Strictosidin-Synthase-Präparation
A: Proteinanfärbung mit Amidoschwarz (19.3 μ g Protein)
B: Strictosidin-Synthase-Aktivitätsverteilung (154 pkat)

Durch Anfärbung mit Amidoschwarz wurden von R_f 0.65 - R_f 0.80 insgesamt 7 Banden sichtbar, deren Auflösung aber zu gering war, um jedem Protein auch Strictosidin-Synthase-Aktivität zuordnen zu können. Die Frage nach der Anzahl der Enzymproteine sollte daher endgültig über ihre Immunreaktion beantwortet werden.

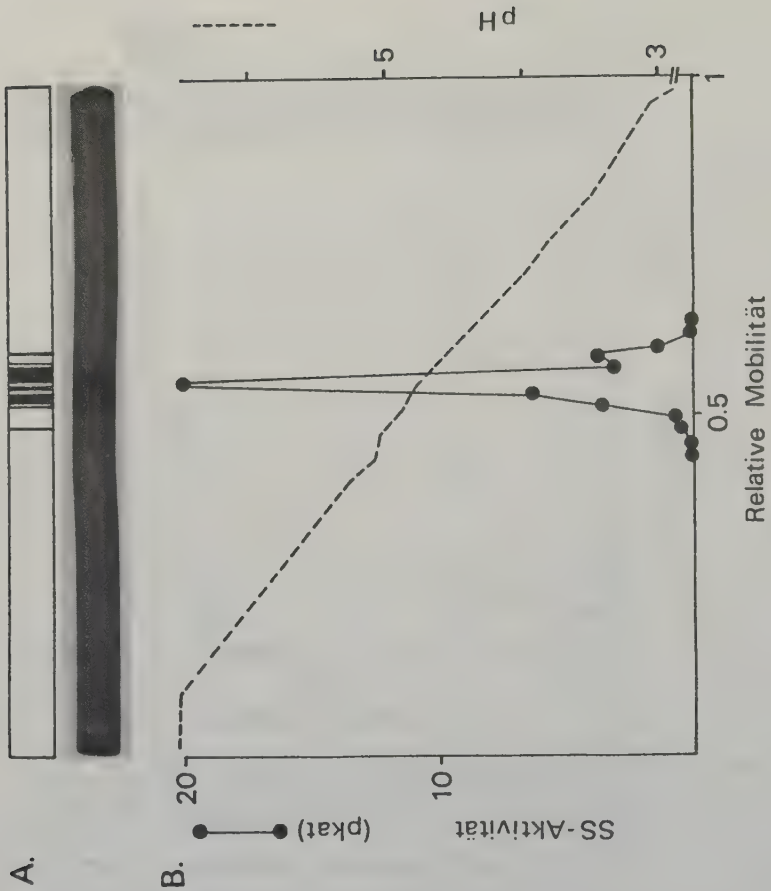


Abb. 34: Nachweis multipler Enzymformen durch Peroxidase-gekoppelte Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline nach Auftrennung in der isoelektrischen Fokussierung

A: Peroxidase-Anfärbung nach Reaktion mit dem Immunkonjugat (82.5 μg Strictosidin-Synthase-Proteine)

B: pH-Gradient und Strictosidin-Synthase-Aktivitätsverteilung (328 pkat)

Dazu wurde das Eluat der Antikörpersäule in einer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt und die Verteilung der Strictosidin-Synthase-Aktivität und der pH-Gradient bestimmt (II.12.). Auf ein weiteres Gel wurden Filterpapierstreifen (Whatman Grade I, 0.5 x 8.5 cm), die in 0.5 ml Peroxidase-gekoppelten Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobulinen (II.14.4.) getränkt worden waren, gelegt. Die Diffusion erfolgte 12 h bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre. Nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit 2% iger NaCl-Lösung und H_2O entfernt und das Gel ca. 1 h in Diaminobenzidindlösung inkubiert (II.14.4.). Wie bei der Anfärbung mit Amidoschwarz (Abbildung 33), so wurden auch hier 7 Banden im Bereich der Strictosidin-Synthase-Aktivität sichtbar (Abbildung 34). Gleichbehandelte Kontrollgele mit Trypsininhibitor aus der Sojabohne zeigten keine Peroxidase-Anfärbung. Auf SDS-Gelen ergab sich dagegen bei 40 000 Dalton nur eine einzige, etwas breitere, aber undifferenzierte mit Coomassie Blue färbbare Zone (Abbildung 35). Verunreinigungen durch Fremdproteine konnten höchstens als Spuren nachgewiesen werden ($< 5\%$). Die Verwendung aller 7 Proteinbanden zur Immunisierung eines Kaninchens führte zur Isolation eines monospezifischen Antiserums und beweist daher, daß es sich hierbei ausschließlich um multiple, immunologisch identische Formen der Strictosidin-Synthase handelt.

Die heterogenen Strictosidin-Synthase-Enzyme sind sich somit sehr ähnlich in ihrem Molekulargewicht und ihrer Tertiärstruktur, tragen aber unterschiedliche Ladungen. Durch Chromatofokussierung war eine Auftrennung in 4 Aktivitätsmaxima gelungen. Betrachtet man die hier erzielten Ergebnisse der Isolation und elektrophoretischen Auflösung von 7 Enzymformen, so müssen der Aktivität I mindestens 1 Enzymprotein, der Aktivität II mindestens 3 Enzymproteine, der Aktivität III minde-

Abb. 35: SDS-Gelelektrophorese einer durch Immunadsorptionschromatographie angereicherten Strictosidin-Synthase-Präparation (2.8 µg Protein)

stens 1 Enzymprotein und der Aktivität IV mindestens 2 Enzymproteine zugeordnet werden.

4.2. Isolation der Strictosidin-Synthase aus C. roseus Pflanzen

Multiple Formen der Strictosidin-Synthase wurden nicht nur aus dem Stamm SR 28 isoliert, sondern in demselben Verteilungsmuster auch aus einer anderen Zelllinie (HAR 6), die aufgrund ihres hohen Alkaloidgehaltes nach Reklonierung von SR 28 selektioniert worden war. Da aber Chromosomenanomalien in C. roseus Suspensionskulturen bekannt sind (DEUS, 1980), sollte das Vorliegen heterogener Enzymproteine zusätzlich an einer intakten Pflanze überprüft werden.

Dazu wurden 175 g frisch gesammelte Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren, ein Proteinrohextrakt hergestellt (II.8.1., 1.4 nkat/g TG) und dieser, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, durch Immunadsorptionschromatographie angereichert. Tabelle 9 faßt die quantitativen Daten zusammen, Abbildung 36 zeigt die Auftrennung der isolierten Enzympräparation in der Polyacrylamidgelelektrophorese. Es ergab sich ein verglichen mit den aus Zellkulturen isolierten Strictosidin-Synthase-Formen ähnliches Anfärbemuster bei der-

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicher- (x-fach)
Rohextrakt	420	784	28.1	0.04	100	1
Ammoniumsulfat- fraktionierung (35-50%), Dialyse	17.0	35.2	5.5	0.16	20	4
Immunadsorp- tionschromato- graphie, Dialyse	5.6	0.051	3.6	71.2	13	1780

Tab. 9: Anreicherung der Strictosidin-Synthase aus 175 g (FG) C. roseus Blättern

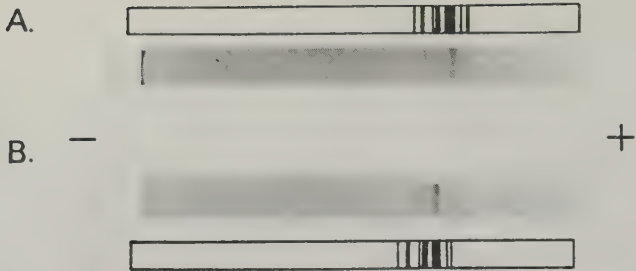


Abb. 36: Vergleich der durch Immunadsorptionschromatographie gereinigten Strictosidin-Synthase-Präparationen aus einer C. roseus Pflanze und aus Zellsuspensionskulturen in der Polyacrylamidgelelektrophorese nach DAVIS (1964) Die Anfärbung der Gele erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue.

- A: Strictosidin-Synthase-Proteine aus Zellkulturen ($3.4 \mu\text{g}$ Protein)
B: Strictosidin-Synthase-Proteine aus Blättern einer Pflanze ($3.2 \mu\text{g}$ Protein)

selben spezifischen Enzymaktivität ($71.2 \text{ nkat/mg Protein}$).

4.3. Untersuchungen zur Natur der multiplen Strictosidin-Synthase-Formen

Die zweifelsfreie Identifizierung multipler Proteinformen wurde erstmals nach Entwicklung der Zymogrammtechnik durch HUNTER und MARKERT (1957) möglich. Seitdem wurde das Phänomen für viele Enzymsysteme beschrieben, wobei die Ursachen der Heterogenität vielfältig sein können (MARKERT und WHITT, 1968). Im folgenden sind in Anlehnung an veröffentlichte Beispiele einige Experimente erläutert, die Aufschluß über die molekularen Unterschiede der Strictosidin-Synthase-Enzyme bringen sollten. Die verwendete Präparation wurde über Immunadsorption des Rohextraktes aus C. roseus Zellkulturen

gereinigt, enthielt also 7 Enzymproteine, deren Verteilung auf Polyacrylamidgelen leicht analysiert werden konnte.

Die multiplen Formen der Strictosidin-Synthase erwiesen sich als temperatur- und pH-stabil. Elektrophoresen im Alkalischen (DAVIS, 1964), unter weniger extremen pH-Bedingungen (WILLIAMS und REISFELD, 1964) und die isoelektrische Fokussierung in saurem Milieu lieferten ganz ähnliche Bandenmuster. Eine Veränderung konnte auch nach 60 minütiger Vorinkubation der Proteinelösung bei 37°C nicht festgestellt werden. Die An- oder Abwesenheit von MSH als Oxidationsschutz zeigte keinen Einfluß.

Als weitere Ursache der Heterogenität der Strictosidin-Synthase-Proteine wurde eine mögliche Modifizierung der Polypeptidkette überprüft. Eine Phosphorylierung der unterschiedlichen Enzymformen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Durch Inkubation der Strictosidin-Synthase-Proteine mit alkalischer Phosphatase (II.5.5.) ergab sich keine Änderung in der elektrophoretischen Mobilität. Positive Hinweise fanden sich dagegen für eine Glykosidierung der einzelnen Enzymformen. In Abbildung 37 ist die Photographie eines nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Natriumperjodat und SCHIFF'schem Reagenz behandelten Polyacrylamidgeles (II.10.3.) wiedergegeben. Alle 7 Strictosidin-Synthase-Proteine zeigten eine Farbreaktion und enthalten somit konjugierte Kohlehydrate.

Andere Experimente sollten eine mögliche physiologische Funktion der multiplen Strictosidin-Synthase-Formen erfassen. Dazu wurden die Proteinrohextrakte vom 6., 12. und 18. Wachstumstag einer C. roseus Zellkultur durch Immunadsorption gereinigt und ihre Heterogenität elektrophoretisch verglichen. Keine der gewonnenen Enzym-

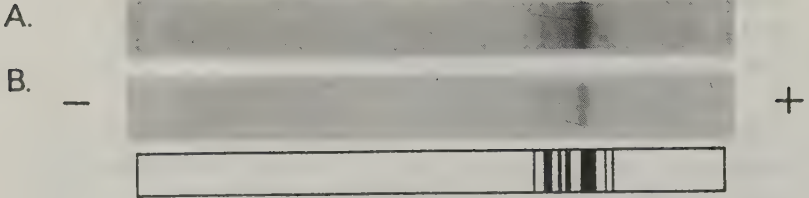


Abb. 37: Glykoproteinnachweis der Strictosidin-Synthase-Enzyme nach Auftrennung auf Polyacrylamidgelen (DAVIS, 1964)

A: Anfärbung mit Amidoschwarz (19.3 μg Protein)

B: Perjodatspaltung und Anfärbung mit SCHIFF'schem Reagenz (164.2 μg Protein)

präparationen zeigte dabei Abweichungen von der bekannten Bandenverteilung. Zusätzlich wurde die molare katalytische Aktivität der durch Ammoniumsulfatfällung (0 - 70%) konzentrierten Rohextrakte verfolgt. Die Enzymaktivität wurde in dem unter II.5.1. erläuterten Standardtest gemessen, der Strictosidin-Synthase-Proteingehalt durch "Rocket"-Immunelektrophorese (II.14.3.4.) bestimmt. Bei der Annahme eines Molgewichtes von 31 000 Dalton (III.2.5.) errechneten sich Werte von 3.5 s^{-1} (6. Tag), 3.3 s^{-1} (12. Tag) und 3.6 s^{-1} (18. Tag). Die Aktivitätszunahme während des Wachstums einer Zellkultur (SEIPEL, 1979) ist somit nicht auf Änderungen der spezifischen Strictosidin-Synthase-Aktivität zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine de novo Synthese aller Enzymformen.

Eine mögliche Kompartimentierung der Strictosidin-Synthase, wie sie z.B. für die Malat-Dehydrogenase-Isoenzyme bekannt ist (DELBRÜCK et al., 1959), wurde durch Auftrennung von Zellorganellen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation untersucht (II.7.). Eine partikelgebundene Enzymaktivität konnte jedoch nicht gemessen werden.

4.4. Immunologische Kreuzreaktion zu Enzymen verwandter Pflanzenarten

Vergleichende Studien über Strictosidin-Synthase-Aktivitäten aus unterschiedlichen Arten der Apocynaceae waren schon von TREIMER und ZENK (1979 a und b) durchgeführt worden. Es zeigte sich dabei ein hohes Maß an Übereinstimmung sowohl in den katalytischen als auch in den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Enzyme. Diese Ergebnisse sollten nun mit Hilfe der gegen C. roseus Strictosidin-Synthase gerichteten Antikörper auf ein weiteres Kriterium, die Proteintertiärstruktur, ausgedehnt werden.

Die Wachstumsbedingungen der Kulturen sind unter II.1.2. in Tabelle 1 zusammengefaßt. Da von Rhazia orientalis keine Suspensionskultur zur Verfügung stand, wurde die intakte Pflanze verwendet. Die isolierten Proteinrohextrakte wurden durch eine 0 - 70% ige Ammoniumsulfatfällung konzentriert und über Nacht gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH dialysiert. Zur Bestimmung der Kreuzreaktion wurden bei einer konstanten Antiserummenge steigende Volumina der verschiedenen Proteinlösungen zugegeben, die Ansätze 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zentrifugation (5 Minuten, 10 000 x g) 50 µl des Überstandes in den Standardenzymtest zur Messung der verbliebenen Strictosidin-Synthase-Aktivität eingesetzt. Die jeweils für einen 50% igen Tryptaminumsatz bezüglich eines konstanten Maximalwertes notwendigen Enzymaktivitäten der unterschiedlichen Proteinlösungen wurden miteinander verglichen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse.

Alle jene Vertreter der Rubiaceae (3 Arten untersucht), die Indolalkaloide enthielten, zeigten Strictosidin-Synthase-Aktivität. Diese konnte jedoch weder in Prä-

Art	Tribus	Familie	SS-Akt. (nkat/l)	SS-Inhibier. Kreuzreakt. (%)	
Catharanthus ¹ roseus	Alstonieae	Apocynaceae	44.3	+	100
Catharanthus ¹ longifolius	Alstonieae	Apocynaceae	8.5	+	> 45
Vinca ¹ herbacea	Alstonieae	Apocynaceae	11.0	+	25
Alstonia ¹ scholaris	Alstonieae	Apocynaceae	1.0	+	n.b.
Rhazia ² orientalis	Alstonieae	Apocynaceae	0.5 ²	+	n.b.
Rauwolfia ¹ serpentina	Rauwolfieae	Apocynaceae	365.0	+	45
Ochrosia ¹ elliptica	Rauwolfieae	Apocynaceae	3.0	+	27
Tabernanthe ¹ iboga	Tabernaemonta- neae	Apocynaceae	21.6	+	45
Ervatamia ¹ divaricata	Tabernaemonta- neae	Apocynaceae	22.1	+	35
Voacanga ¹ africana	Tabernaemonta- neae	Apocynaceae	36.0	+	32
Stemmadenia ¹ tomentosa	Tabernaemonta- neae	Apocynaceae	17.3	+	25

Art.	Tribus	Familie	SS-Akt. (nkat/l)	SS-Inhibier. Kreuzreakt. (%)
Mitragyna ¹ speciosa	Naucleaeae	Rubiaceae	0.8	0
Nauclea ¹ latifolia	Naucleaeae	Rubiaceae	25.9	0
Nauclea ² latifolia	Naucleaeae	Rubiaceae	0.04 ²	0
Uncaria ¹ gambir	Naucleaeae	Rubiaceae	12.8	0
Nicotiana ¹ sylvestris	-	Solanaceae	0	

Tab. 10: Kreuzreaktion von Enzympräparationen aus unterschiedlichen Pflanzenarten mit C. roseus Strictosidin-Synthase-Antikörpern¹

Zellsuspensionskulturen als Enzymquelle verwendet,¹
differenzierte Pflanzen als Enzymquelle verwendet, Enzymaktivität in nkat/g TG,²

parationen aus Zellkulturen noch aus intakten Pflanzen durch Anti-C. roseus-Strictosidin-Synthase-Immunglobuline negativ beeinflusst werden. Dagegen wiesen alle Apocynaceae-Enzyme (10 Arten untersucht) eine deutliche Hemmung nach Antiserumzugabe auf, wobei die Kreuzreaktion innerhalb der Gattung Catharanthus am größten war. Gleichzeitig wurde auch versucht, das Ausmaß gemeinsamer antigenen Determinanten der unterschiedlichen Strictosidin-Synthase-Präparationen durch "Rocket"-Immunelektrophorese zu bestimmen. Bei Anwendung des unter II.14.3.4. beschriebenen Systems präzipitierte aber nur C. longifolius Strictosidin-Synthase. Die errechnete spezifische Enzymaktivität betrug 54.0 nkat/mg Protein verglichen mit 107.5 nkat/mg Protein für die Strictosidin-Synthase aus C. roseus. Hieraus ergibt sich eine Kreuzreaktion von 50% unter der Annahme derselben spezifischen Aktivität beider Enzyme.

Die gegen C. roseus Strictosidin-Synthase gerichteten Antikörper eignen sich damit auch zur Isolation der Enzymaktivitäten aus anderen Apocynaceae-Arten. Zusammen mit den in den vorausgehenden Kapiteln vorgestellten physikochemischen Methoden zur Auftrennung der multiplen Formen sind so die Grundlagen geschaffen, das Phänomen der Heterogenität an verschiedenen Präparationen zu studieren und biochemische Untersuchungen zur Aminosäure- und Kohlehydratzusammensetzung einzelner Proteine in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

5. Immobilisierung der Strictosidin-Synthase zur präparativen Darstellung des Enzymproduktes

Strictosidin stellt als zentrales Intermediat der monoterpenoiden Indolalkaloide in höheren Pflanzen (STÖCKIGT, 1980) die Vorstufe auch mehrerer pharmazeutisch genutzter Verbindungen dar. Aus diesem Grund sind in der Vergangenheit einige Versuche unternommen worden, aus dieser Substanz abgeleitete Naturstoffderivate in synthetischen Reaktionssequenzen zu gewinnen (BROWN, 1980). Stereochemisch reines Strictosidin als Ausgangsverbindung für diese biomimetischen Umwandlungen stand bisher allerdings nur in beschränktem Maße zur Verfügung. Die Substanz mußte entweder aus Rhazia-Arten nach der von SMITH (1968) ausgearbeiteten Prozedur isoliert oder aus chemischen Kondensationsansätzen der Reaktionspartner Tryptamin und Secologanin von dem ebenfalls gebildeten Isomeren, Vincosid, abgetrennt werden (BATTERSBY et al., 1969 a, BROWN et al., 1978). Als wesentlicher Vorteil bei der präparativen Darstellung des Glukoalkaloids erschien daher der Einsatz der Strictosidin-Synthase-Proteine. Die enzymkatalysierte Kondensation verläuft stereospezifisch, so daß die Substratmoleküle ausschließlich in die biogenetisch aktive Verbindung mit 3 α (S)-Konfiguration überführt werden (STÖCKIGT und ZENK, 1977 a und b, STÖCKIGT, 1979).

5.1. Reinigung der Strictosidin-Synthase

Die in den vorausgehenden Kapiteln beschriebenen Methoden zur Anreicherung der Strictosidin-Synthase aus C. roseus Zellkulturen umfaßten alle mehrere Chromatographieschritte und/oder führten zu erheblichen Aktivitätsverlusten während der Aufarbeitung. Voraussetzung zur Akkumulation eines Zwischenproduktes sind

aber weniger homogene Proteinpräparationen als vielmehr die quantitative Ausschaltung der im Biosyntheschema folgenden Reaktion. Bereits in den ersten Versuchen zur zellfreien Bildung der Heteroyohimbin-Typ-Alkaloide konnte eine Strictosidin-metabolisierende β -Glukosidase-Aktivität nachgewiesen werden (TREIMER und ZENK, 1978, s. auch Abbildung 3), deren katalytische und physikochemische Eigenschaften HEMSCHIEDT und ZENK (1980) näher charakterisierten. Es wurden 2 Enzyme identifiziert, die ein wesentlich größeres Molekulargewicht (230 000 Dalton bzw. > 450 000 Dalton) als die Strictosidin-Synthase (31 000 Dalton, III.2.5.) aufwiesen. Dieser Umstand wurde hier zur Abtrennung der Hydrolasen durch Gelfiltration genutzt.

Ein Rohextrakt wurde aus 1 kg eingefrorenem C. roseus Zellgewebe hergestellt (II.8.2.), durch Ammoniumsulfatfällung (35 - 50%) konzentriert und die Proteinlösung nach Dialyse auf eine mit Ultrogel ACA 44 gefüllte Säule gegeben (II.9.1.). Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf Strictosidin-spezifische β -D-Glukosidase-Aktivität (II.5.3.), p-Nitrophenyl- β -D-Glukosid-spaltende Enzyme (II.5.4.) und Strictosidin-Synthase (II.5.1.) getestet. Abbildung 38 zeigt das Elutionsprofil.

Die Strictosidin-spezifischen Glukosidasen wurden vollständig mit der Pufferfront eluiert. Die p-Nitrophenyl- β -D-Hydrolase-Aktivität zeigte dagegen ein ähnliches Laufverhalten wie die Strictosidin-Synthase. Um die Tauglichkeit der enzymhaltigen Fraktionen auf Glukoalkaloidakkumulation zu überprüfen, wurde ein Aliquot aus dem Gläschen 70 (je 15 pkat Strictosidin-Synthase und p-Nitrophenyl- β -D-Glukosidase) 13 h mit Secologanin, Tryptamin und $[1'-^{14}\text{C}]$ Tryptamin inkubiert und anschließend dünnschichtchromatographisch

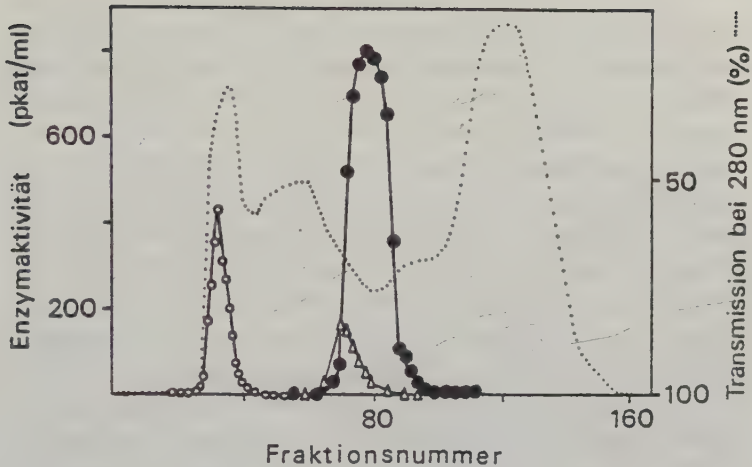


Abb. 38: Trennung von Strictosidin-spezifischen β -D-Glukosidasen ($\circ$), p-Nitrophenyl- β -D-Glukosid-spaltenden Enzymen ($\triangle$) und Strictosidin-Synthase ($\bullet$) durch Chromatographie an Ultrogel ACA 44
Die Elutionsbedingungen sind im Methodenteil (II.9.1.) erläutert.

in dem Fließmittelsystem I (II.5.2.) analysiert. Als einziges Reaktionsprodukt wurde Strictosidin identifiziert. Unpolares, nicht glukosidiertes Material konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von HEMSCHIEDT und ZENK (1980), die den für synthetische Substrate spezifischen Glukosidasen aus C. roseus keine Bedeutung in der Biosynthese der monoterpenoiden Indolalkaloide zuschrieben.

Strictosidin-Synthase-haltige Fraktionen (70 - 92) wurden vereinigt und in der Berghof-Zelle auf 20 ml eingengt. Die spezifische Aktivität der isolierten Enzympräparation betrug 2.4 nkat/mg Protein bei quantitativer Strictosidin-Synthase Ausbeute (90 - 100%).

5.2. Immobilisierung der Strictosidin-Synthase

Voraussetzung zur kontinuierlichen Nutzung eines Biokatalysators ist die ständige Anreicherung des Reaktionsraumes mit Substratmolekülen und die Entfernung der gebildeten Produkte. Hierzu sind in den letzten Jahren mehrere Verfahren der schonenden physikalischen oder chemischen Immobilisierung von Enzymen unter Erhalt ihrer katalytischen Aktivität entwickelt worden (CHIBATA, 1978). Die Proteine werden dabei in engmaschige Netzwerke oder semipermeable Membranen eingeschlossen, durch bifunktionelle Agentien mittels Quervernetzung polymerisiert oder kovalent bzw. assoziativ an Trägermoleküle gebunden und als hochmolekulare, wasserunlösliche Festphasenkatalysatoren von dem Reaktionsgemisch umspült. Zur Fixierung der Strictosidin-Synthase wurde die weit verbreitete Technik von PORATH und Mitarbeitern angewandt (AXEN et al., 1967, PORATH et al., 1967).

Dazu wurde die nach Gelfiltration von Strictosidin-Glukosidase-Aktivität freie Enzymlösung gegen 10 Liter 0.1 M NaHCO_3 -Puffer, 0.5 M NaCl dialysiert, jeweils 42 mg Protein an 2 g CNBr-aktivierte Sepharose gebunden (II.15.) und das derivatisierte Gel bei 4°C in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 unter Zugabe von 0.02% NaN_3 gelagert. Die durchschnittliche Kopplungsrate betrug 98% bezüglich der eingesetzten Proteinmenge und 40% bezüglich der Strictosidin-Synthase-Aktivität des löslichen Enzyms.

5.3. Charakterisierung der immobilisierten Strictosidin-Synthase

Die katalytischen Eigenschaften der trägergebundenen Strictosidin-Synthase-Präparation wurden mit jeweils

10 pkat Enzymaktivität im Standardtest unter ständigem Schütteln der Ansätze aufgenommen. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die ermittelten Daten im Vergleich zu der homogenen, löslichen Strictosidin-Synthase-Form III.

Drastische Veränderungen der katalytischen Parameter durch die Enzymimmobilisierung konnten nicht nachgewiesen werden. Allerdings waren die Substrathemmung der gebundenen Strictosidin-Synthase durch Tryptaminkonzentrationen >1 mM (Tabelle 11) und Aktivitätsverluste aufgrund von Denaturierungen, insbesondere im sauren Teil der pH-Abhängigkeit, weniger ausgeprägt. So wies das lösliche Protein bei pH 4 nur 7% Restaktivität bezüglich des Maximalumsatzes im pH-Optimum auf, während das immobilisierte Enzym noch 23% verbliebene Aktivität zeigte.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt der präparativen Produktsynthese durch Proteine ist ihre operationale Stabilität. Dieser Begriff umschreibt die Aktivitätsabnahme des Enzyms bei der Reaktionstemperatur in Abhängigkeit von der Nutzzeit. Zur Messung dieser Größe wurden die immobilisierte Strictosidin-Synthase und eine lösliche Proteinpräparation derselben Reinheitsstufe in Gegenwart von 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 und 0.02% NaN_3 bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde jeweils ein Aliquot entnommen und die verbliebene Enzymaktivität im Standardtest bestimmt. Abbildung 39 zeigt den Vergleich der beiden Inaktivierungskinetiken. Während die lösliche Strictosidin-Synthase Präparation unter den gewählten Bedingungen eine Halbwertszeit von ca. 5 h aufwies, waren in der Gel-suspension 50% der eingesetzten Enzymaktivität noch nach 68 tägiger Inkubation nachzuweisen. Die Aufbewahrung des immobilisierten Enzyms bei 4°C in Anwesenheit von 0.02% NaN_3 verursachte selbst nach 3 jähriger

	immobilisiertes Enzym	lösliches Enzym III
pH-Optimum	6.4	6.7
Tryptamin		
K_m	0.9 (mM)	1.9
V_{max}	18.9 (pkat)	48.0
Substratinhibierung	> 0.88 (mM)	> 0.83
Inhibierung bei 2.5 mM		
Substratkonzentration	17 (%)	44
Secologanin		
Kooperativität	positiv	positiv

Tab. 11: Vergleich der katalytischen Eigenschaften einer immobilisierten Strictosidin-Synthase-Präparation mit homogenem, löslichem Enzym III

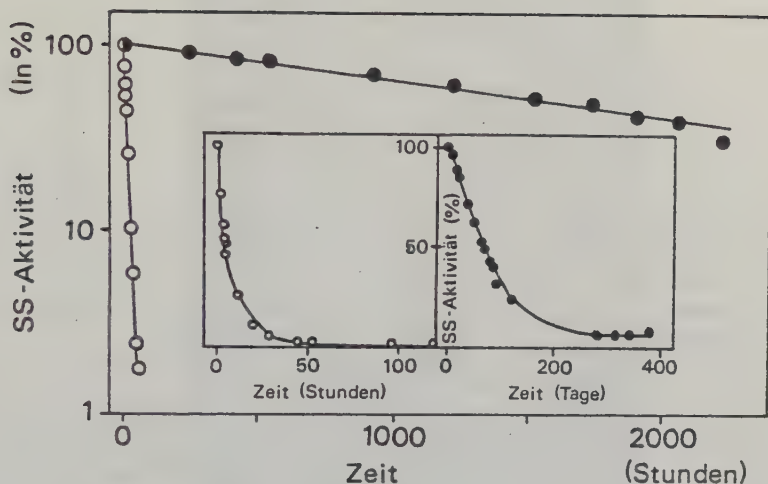


Abb. 39: Vergleich der thermischen Inaktivierung immobilisierter Strictosidin-Synthase (●, Halbwertszeit 68 Tage) und einer löslichen Präparation gleichen Reinheitsgrades (○, Halbwertszeit 5 Stunden)

Lagerzeit keine signifikante Aktivitätseinbuße. Die deutlich gesteigerte Stabilität der gebundenen Strictosidin-Synthase zusammen mit der Stereospezifität der enzymkatalysierten Reaktion stellen somit ideale Voraussetzungen für die präparative Strictosidinsynthese dar.

5.4. Präparative Synthese von Strictosidin

Zur kontinuierlichen Produktbildung wurde ein Durchflußverfahren gewählt (Abbildung 40). Dazu wurde die Gelsuspension (40 nkat Strictosidin-Synthase, immobilisiert an 2 g CNBr-aktivierte Sepharose) in eine Glas-

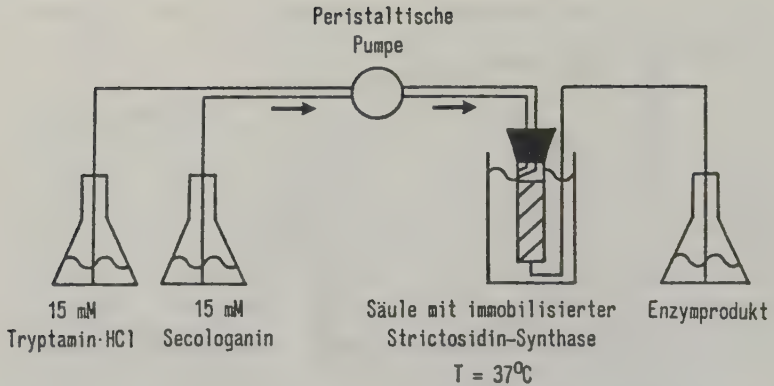


Abb. 40: Schematische Versuchsanordnung für die präparative Strictosidin-Synthese aus Tryptamin und Secologanin durch immobilisierte Strictosidin-Synthase

säule (1 x 6 cm) gefüllt und nach gründlichem Waschen mit H_2O in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad eingetaucht. Anschließend wurden wässrige, ungepufferte Lösungen von Tryptamin-HCl und Secologanin (jeweils 15 mM, pH 6 - 7) in Vorratsgefäßen bereitgestellt. Die Substrate wurden durch eine Pumpe in getrennten Schläuchen mit einer Flußrate (jeweils 3 ml/h), die ca. 50% unter dem kalkulierten Kondensationsmaximum lag, befördert und erst im Säulenbettüberstand gemischt. Dadurch sollte die chemische Reaktion zu einem Racemat aus Strictosidin und Vincosid vermieden werden. Das eisgekühlte Eluat wurde in 12 stündigem Rhythmus gesammelt und dünnschichtchromatographisch in den Fließmittelsystemen I und II (II.5.2.) überprüft. Die Umsetzung von Secologanin und Tryptamin erfolgte quantitativ. Die Säule wurde ohne Unterbrechungen 12 Tage lang betrieben, wobei das Gelbett jeden 3. Tag für ca. 8 h mit 0.02% iger NaN_3 -Lösung zur Unterdrückung bakteriellen

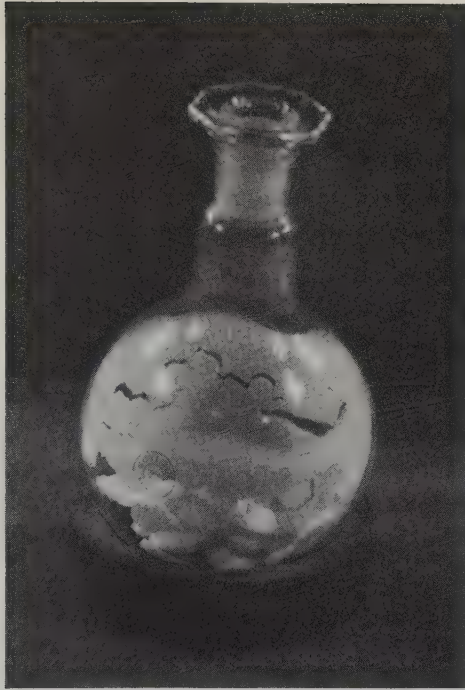


Abb. 41: Ca. 0.5 g gefriergetrocknetes Strictosidin, gewonnen durch immobilisierte Strictosidin-Synthase

Wachstums gespült wurde. Änderungen der Umsatzrate konnten während dieser Zeit nicht festgestellt werden. Insgesamt wurden 6 g einer leicht gelblichen Substanz durch Gefriertrocknung des Säuleneluates isoliert (Abbildung 41).

5.5. Charakterisierung des Enzymproduktes

Die dünnschichtchromatographische Analyse des Enzymproduktes erfolgte in den Fließmittelsystemen I und II unter Co-Chromatographie von authentischem Strictosidin und ergab übereinstimmende R_f -Werte. Im Durchschnitt waren 95% des UV-absorbierenden Materials in der Strictosidinbande lokalisiert (II.16.). Vincosid, das in dem alkalischen System I (II.16.) quantitativ in sein Lactam überführt wird (STÖCKIGT, 1979) und dadurch ein anderes Laufverhalten zeigt (R_f Vincosidlactam $< R_f$ Strictosidin), konnte nicht nachgewiesen werden. Die Umsetzung von Tryptamin und Secologanin ist also allein auf die Katalyse des immobilisierten Enzyms zurückzuführen. Das UV-Spektrum der isolierten Verbindung war ebenfalls identisch mit authentischem Strictosidin (UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 289, 280, 272, 225).

Zur Derivatisierung wurden 33.2 mg des Enzymproduktes mit einem 1/1 (v/v) Gemisch aus Pyridin und Acetanhydrid versetzt und der Reaktionsansatz nach Hydrolyse auf Kieselgeldickschichtplatten in dem Fließmittelsystem III (II.16.) aufgetrennt (BATTERSBY et al., 1969 a). Die UV-absorbierende Bande bei R_f 0.15 wurde ausgekratzt, mit Methanol eluiert und zu einem weißen Schaum (24.9 mg) mit den folgenden spektroskopischen Eigenschaften eingengt.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 289, 281, 272, 225.

MS m/z (rel. Int. %): 740 (M^+ , 6), 698 (15), 697 (32),
409 (9), 394 (12), 392 (6), 377 (6),
374 (6), 373 (6), 349 (16), 333 (6),
331 (6), 323 (13), 322 (10), 321 (10),
320 (9), 297 (6), 291 (7), 290 (6),
279 (7), 265 (10), 264 (10), 252 (6),
251 (6), 227 (15), 226 (12), 216 (6),

215 (6), 214 (38), 213 (100), 185 (10),
184 (9), 183 (7), 172 (7), 171 (46),
170 (15), 169 (49), 168 (7), 167 (6),
165 (10), 157 (12), 156 (7), 155 (6),
154 (7), 145 (10), 144 (10), 143 (7),
140 (9), 139 (7), 137 (17), 115 (22),
110 (6), 109 (29).

CD $\lambda_{\text{max}}^{\text{Acetonitril}}$ ($\Delta \epsilon$): 233 (-15.2), 216 (-7.6),
198 (+7.1).

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3360 (br, NH), 1755 (C=O), 1700 (C=C),
1630, 1425, 1370, 1220, 1060, 1035.

Alle Daten stimmen mit den von STÖCKIGT (1979) publizierten Ergebnissen für Strictosidinpentaacetat überein.

Ein anderes Aliquot des Enzymproduktes (99.9 mg) wurde zunächst in das Lactam überführt und anschließend acetyliert (BATTERSBY et al., 1969 a). Der Reaktionsansatz wurde nach dickschichtchromatographischer Reinigung noch einmal auf DC-Folien aufgetrennt (Fließmittelsystem III). 20.7 mg eines weißen Schaumes wurden isoliert.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 289, 281, 272, 225.

MS m/z (rel. Int. %): 666 (M^+ , 7), 335 (6), 331 (7),
319 (9), 289 (6), 271 (5), 267 (4),
266 (7), 265 (11), 264 (4), 236 (4),
235 (7), 211 (7), 171 (9), 170 (13),
169 (100), 149 (13), 145 (9), 144 (15),
143 (22), 139 (6), 127 (26), 109 (76).

CD $\lambda_{\text{max}}^{\text{Acetonitril}}$ ($\Delta \epsilon$): 270 (+9.3), 238 (-5.7),
201 (-15.5).

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3360 (br, NH), 1750 (C=O), 1655 (C=O),
1590 (C=C).

^1H -NMR 400 MHz, CDCl_3 , TMS = 0: δ 1.23 (3H, s, -OCOMe),
1.87 (3H, s, -OCOMe), 1.97 (3H, s, -OCOMe),
2.07 (3H, s, -OCOMe), 7.87 (1H, s, -NH).

Alle spektroskopischen Meßergebnisse stehen in Einklang mit den von STÖCKIGT (1979) veröffentlichten Werten für Strictosidinlactamtetraacetat. Auf eine Bildung von Vincosid während der enzymatischen Kondensationsreaktion fanden sich keinerlei Hinweise.

Das beschriebene Verfahren der Enzymimmobilisierung stellt eine wesentliche Erleichterung zur Gewinnung von stereochemisch reinem Strictosidin dar. Geeignete Proteinpräparationen werden in einem einfachen Chromatographieschritt isoliert und durch Fixierung höherer Enzymaktivitäten kann die Syntheserate in beliebigem Maße gesteigert werden. Da die Substrate als weitgehend salzfreie Lösungen während der Passage der Matrix vollständig zu Strictosidin metabolisiert wurden, war eine Aufarbeitung des Säuleneluates zur Abtrennung von verunreinigenden Substanzen oder Pufferionen nicht notwendig. Das Enzymprodukt wurde durch Gefriertrocknung in quantitativer Ausbeute isoliert und direkt für die im folgenden beschriebenen Modifizierungsexperimente verwendet.

6. Transformation von Strictosidin durch C. roseus Zellkulturen

Die Ausnutzung des biochemischen Potentials eines lebenden Systems zur Gewinnung pharmazeutisch interessanter Substanzen wurde 1952 von PETERSON et al. mit der 11-Hydroxylierung von Progesteron als Teilschritt der Cortisonsynthese mittels des Pilzes Rhizopus nigricans inspiriert. Die Autoren lösten dadurch eine intensive Suche nach weiteren Organismen zur Verwendung in industriellen Prozessen aus. Eine von pflanzlichen Zellen katalysierte Transformationsreaktion mit Modellcharakter wurde kürzlich ebenfalls in der Steroidchemie etabliert. REINHARD et al. (1975) gelang in Kulturen des Fingerhutes die 12-Hydroxylierung von β -Methyldigoxin zu dem kommerziell verwertbaren β -Methyldigoxin.

Im folgenden sind einige einführende Versuche zur Bio-konversion von Strictosidin geschildert. Hierzu wurden C. roseus Suspensionskulturen ausgewählt, da sie aufgrund ihrer chemischen Potenz zur Synthese pharmazeutisch genutzter Sekundärstoffe besonders geeignet schienen und das Alkaloidmuster der verwendeten Zelllinie bereits publiziert war (STÖCKIGT und SOLL, 1980).

100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml LS-Medium (LINSMAIER und SKOOG, 1965) wurden mit jeweils 1 ml feuchter Zellmasse beimpft und zunächst unter den im Methodenteil (II.1.2.) erläuterten Bedingungen angezogen. Am 6. Wachstumstag wurden zu Versuchskulturen 5 mg Strictosidin und 500 nCi enzymatisch synthetisiertes [$5-^{14}\text{C}$] Strictosidin (II.5.2.), gelöst in 0.2 ml Methanol, hinzugegeben. Nach 2 tägiger Inkubation wurde das Zellgewebe vom Kulturmedium durch Vakuumfiltration abgetrennt und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Die Extraktion der Alkaloidfraktion wurde in Anlehnung an A.PFITZNER (1984) durchgeführt.

Dazu wurden zu der Zellmasse 1 ml 1 M Kaliumboratpuffer pH 8.5 und 70 ml Essigester gegeben und die Suspension 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Extraktes wurde in den Fließmittelsystemen IV und V (II.16.) durchgeführt. Abbildung 42 zeigt die Analyse der DC-Folien auf die Verteilung UV-absorbierenden und radioaktiv markierten Materials im Vergleich zu dem identisch aufgearbeiteten Auszug einer nicht gefütterten Kultur. Beide Verfahren zeigten übereinstimmend den Einbau von Strictosidin in mehrere Substanzen, während Alkaloide im Kontrollextrakt unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnten. Die Identifizierung der gebildeten Naturstoffe wurde anhand der in der Literatur beschriebenen UV- und Massenspektren und durch Co-Chromatographie mit Referenzen in jeweils 3 unterschiedlichen Fließmitteln durchgeführt (STÖCKIGT und SOLL, 1980). Vinervin wurde darüberhinaus in das Acetat überführt, dessen Identität ebenfalls massenspektroskopisch bestätigt wurde. Der stark blau fluoreszierende Substanzfleck bei R_f 0.64 (Fließmittelsystem IV) erwies sich nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der NaBH_4 -Reduktionsprodukte als ein Gemisch aus Serpentin und Alstonin. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die isolierten Strukturen und die ermittelten Einbauraten bezüglich der eingesetzten Radioaktivitätsmenge.

Experimente zur weiteren Steigerung der Sekundärstoffausbeute durch eine einmalige Fütterung größerer Strictosidindmengen scheiterten. Die mit 10 mg/25 ml Medium behandelten Kulturen zeigten eine deutliche Abnahme des Frischgewichtes gegenüber der Kontrolle und me-

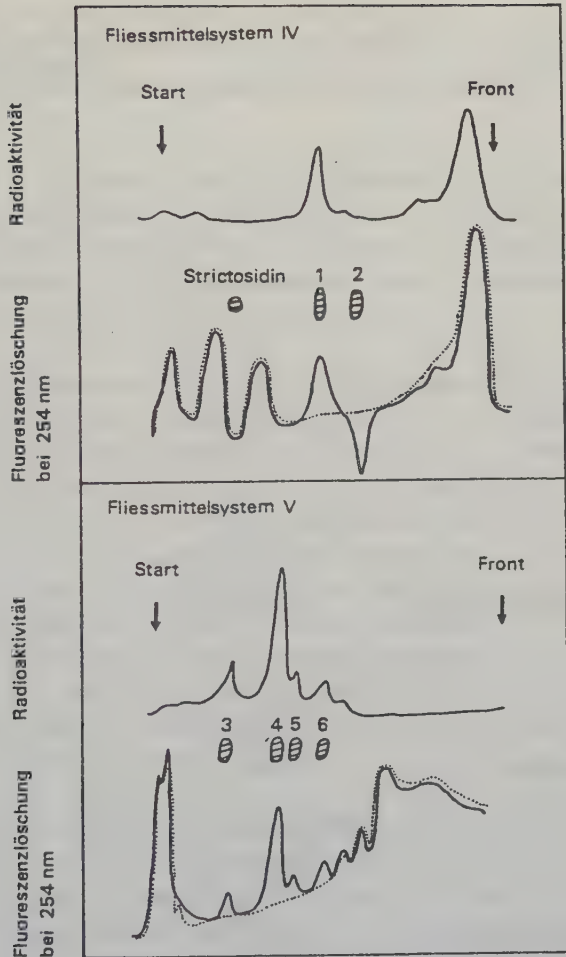
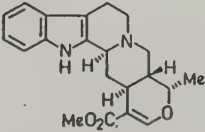
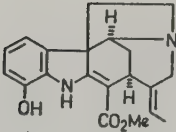
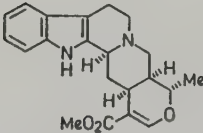
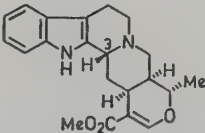
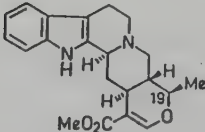
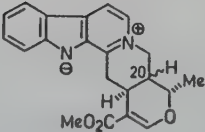


Abb. 42: Analyse des Alkaloidextraktes einer mit Strictosidin (5 mg, 500 nCi) gefütterten C. roseus Suspensionskultur (—) im Vergleich zum Auszug einer unbehandelten Kontrolle (...). Die Extrakte wurden zunächst im Fließmittelsystem IV chromatographiert. In der Lösungsmittelfront laufende, radioaktiv markierte Substanzen wurden anschließend mit Methanol eluiert und im System V aufgetrennt.

1 Vinervin	2 Serpentin/Alstonin	3 Akuammigin
4 Ajmalicin	5 19-epi-Ajmalicin	6 Tetrahydroalstonin

Alkaloid		Einbaurate (%)
Ajmalicin		16.5
Vinervin		15.8
Tetrahydroalstonin		3.3
Akuammigin		3.3
19-epi-Ajmalicin		2.0
Serpentin (20-β) Alstonin (20-α)		2.0

Tab. 12: Transformation von Strictosidin durch
C. roseus Zellsuspensionskulturen

tabolisierten die Vorstufe mit wesentlich geringerer Effizienz. Es wurde daher die Möglichkeit untersucht, durch sukzessive Strictosidingaben den Alkaloidgehalt zu erhöhen.

Dazu wurden 3 Kolben angeimpft und beginnend mit dem 6. Wachstumstag nach dem in der Tabelle 13 angedeuteten Schema Strictosidin und $[5-^{14}\text{C}]$ Strictosidin gefüttert. 48 h nach der letzten Substanzzugabe wurde das Zellgewebe abgeerntet und aufgearbeitet.

Die dünnenschichtchromatographische Radioaktivitätsverteilung der Extrakte nach 1 bzw. nach 2 Fütterungszyklen war vollkommen identisch. Die angebotene Vorstufe wurde also zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 gleich gut verwertet. Die aufgetrennten Substanzflecken der Hauptalkaloide wurden nach 2 maliger Chromatographie in unterschiedlichen Fließmitteln mit Methanol eluiert und über ihre UV-Spektren quantifiziert (Tabelle 13). Der Sekundärstoffgehalt der behandelten Kulturen lag deutlich über der Kontrolle, wobei die erläuterte Nachfütterungstechnik noch einmal eine Steigerung der Ausbeute um den Faktor 2 bewirkte.

Die Isolation der Strictosidin-Synthase aus C. roseus, ihre Immobilisierung und kontinuierliche Nutzung zur Akkumulation des Enzymproduktes sowie die Biotransformation des Glukoalkaloids stellen somit ein weiteres erfolgreiches Beispiel in der Verwendung pflanzlicher Zellkulturen zur Gewinnung komplexer Inhaltsstoffe dar.

Kolben	Fütterungsschema	TG (g/25 ml)	Vinervin (µg/25 ml)	Ajmalicin (µg/25 ml)	Tetrahydroalst. (µg/25 ml)
Q: Kontrolle	-	0.44	<10	<10	<10
1: 5 mg	t ₁ : 5 mg Strictosidin 500 nCi [5- ¹⁴ C]- Strictosidin	0.40	90	236	47
	t ₂ : -				
2: 2 x 5 mg	t ₁ : 5 mg Strictosidin t ₂ : 5 mg Strictosidin 500 nCi [5- ¹⁴ C]- Strictosidin	0.36	202	431	118

Tab. 13: Transformation von Strictosidin durch C. roseus Zellsuspensionskulturen
Die Zugabe von 10 mg Strictosidin erfolgte in 2 Portionen (je 5 mg) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (t₁ und t₂) im Abstand von 5 Stunden. Die Einbauraten waren identisch mit den in Tabelle 12 aufgeführten Werten.

IV. DISKUSSION

Die Nutzung von Naturstoffproduzenten beschränkt sich heute nicht mehr allein auf die Ausbeutung des biochemischen Potentials ausgewählter Hochleistungsstämme. Mit der Erforschung der molekularen Grundlagen des Lebens sind vielmehr Techniken zur kontrollierten genetischen Veränderung von Organismen verfügbar geworden. So können z.B. Substanzen wie Insulin oder Interferon, die natürlich nur in beschränktem Maße vorkommen, aber von weitreichender Bedeutung in der klinischen Therapie sind, bereits in industrieller Großproduktion durch variante Stämme des Bakteriums Escherichia coli synthetisch hergestellt werden. Voraussetzung für jeden gezielten Eingriff in das Erbgut ist aber zunächst die exakte Analyse der Genprodukte. Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein zentrales Enzym des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die Strictosidin-Synthase, proteinchemischen Untersuchungen zugänglich gemacht und seine Eignung als Biokatalysator in vitro geprüft werden.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung des Enzyms wurden selektierte Zellsuspensionskulturen von Catharanthus roseus (DEUS, 1980), die schon bei der Aufklärung der Heteroyohimbinbiosynthese erfolgreich eingesetzt worden waren, verwendet. Daher können die erzielten Ergebnisse mit allen bisher publizierten Daten (TREIMER und ZENK, 1979 b, MIZUKAMI et al., 1979) über die Reinigung und Charakterisierung der Strictosidin-Synthase direkt verglichen werden.

Die Anreicherung des Enzyms erfolgte unter Anwendung physikochemischer Proteinreinigungsmethoden oder durch Immunadsorption aus Rohextrakten, wobei alle ausgearbeiteten Prozeduren zur Isolation mehrerer Strictosidin-Synthase-Proteine führten. Die Frage, ob ein Enzym

in multiplen Formen vorliegen kann, war lange umstritten und heterogene Proteinpräparationen wurden im allgemeinen zunächst als Isolierungsartefakt angesehen (z.B. MEISTER, 1950). Der erste Nachweis natürlich vorkommender Multiplizität gelang HUNTER und MARKERT (1957) mit der elektrophoretischen Auftrennung von Extrakten aus der Mäuseleber in zahlreiche, katalytisch aktive Esterasebanden. Die artifizielle Entstehung heterogener Proteinformen unter in vitro Bedingungen ist aber ebenfalls in der Literatur anhand einiger Beispiele zitiert und muß als potentielle Ursache bei jedem Auftreten multipler Enzymaktivitäten zunächst in Erwägung gezogen werden (MARKERT und WHITT, 1968). Für die Strictosidin-Synthase-Enzyme ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise auf Modifizierungen durch Wechselwirkung mit dem umgebenden Milieu oder durch einen proteolytischen Abbau während der Reinigungsprozedur. Das Vorliegen multipler Enzymformen der Strictosidin-Synthase in C. roseus Zellsuspensionskulturen und Pflanzen in vivo wird daher als Ergebnis dieser Arbeit erstmals postuliert. Berichte von MIZUKAMI et al. (1979) und TREIMER und ZENK (1979 b) über eine isolierte, einheitliche Strictosidin-Synthase-Aktivität sind somit als unvollständig zu betrachten.

Durch die Entwicklung neuer Proteinreinigungsmethoden mit erhöhtem Trennvermögen nahm in den letzten Jahren die Anzahl der Veröffentlichungen über den Nachweis heterogener Enzymsysteme ständig zu. So wird das Phänomen heute häufig beobachtet und gilt als allgemein verbreitet (MARKERT, 1975). Dies veranlaßte die IUPAC (1977), Richtlinien zur Nomenklatur und Klassifizierung multipler Enzymformen aufzustellen (Tabelle 14). Im folgenden wird versucht, die Strictosidin-Synthase-Proteine unter Berücksichtigung aller gesammelten Daten in dieses Schema einzuordnen.

Gruppe	Ursache der Multiplizität
1. ¹	Proteine, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden
2. ¹	Heteropolymere (Hybride), die sich aus zwei oder mehreren unterschiedlichen, nicht kovalent verbundenen Polypeptiketten zusammensetzen
3. ¹	Proteine, die von allelen Genen abstammen (Allelozyme)
4 a.	Proteine, die durch Konjugation mit anderen Gruppen modifiziert sind
4 b.	Proteine, die sich von einer einzigen Polypeptidkette ableiten (z.B. Zymogene)
5.	Polymere aus identischen Untereinheiten
6.	Proteine unterschiedlicher Konformation

Tab. 14: Klassifizierung multipler Enzymformen (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1977)

Nur die mit ¹ gekennzeichneten Gruppen werden zu den Isoenzymen gezählt. Proteine der Klassen 4 - 6 werden dagegen unter dem Begriff "multiple Formen" zusammengefaßt.

Veränderungen im elektrophoretischen Enzymverteilungsmuster konnten weder bei extremen pH-Werten, noch nach längerer Inkubation bei 37°C oder Renaturierung einer mit 6 M Guanidin·HCl behandelten Probe beobachtet werden. Die Variabilität der Strictosidin-Synthase-Proteine ist somit ein stabiler physikalischer Zustand, der nur durch molekulare Unterschiede der einzelnen Formen erklärt werden kann. Die Zugehörigkeit zu den Konformationsisomeren der Gruppe 6 wird daher ausgeschlossen.

Ebensowenig ergaben sich Hinweise darauf, daß die Multiplizität der Strictosidin-Synthase-Proteine durch Aggregation mehrerer Untereinheiten bedingt sein könnte. Da sich bei der Bestimmung des Molekulargewichtes unter nativen Bedingungen (Gelfiltration) sogar ein kleinerer Wert als in denaturierendem Milieu (SDS-Gelelektrophorese) errechnete, wird eine Eingliederung in die Kategorien 2 oder 5 nicht in Betracht gezogen.

Das Auftreten von Isoenzymen, die von allelen Genen abstammen (Gruppe 3), ist in der Literatur besonders gut am Beispiel des Hämoglobins dokumentiert, von dem bisher mehr als 250 variante Moleküle aus dem menschlichen Organismus isoliert und charakterisiert werden konnten (BUNN et al., 1977). Die aus unterschiedlichen Zelllinien und aus einer differenzierten Pflanze extrahierten Strictosidin-Synthase-Formen zeigten jedoch identische Proteinbandenmuster nach elektrophoretischer Auftrennung. Die Existenz alleler Gene in C. roseus ist daher ebenfalls auszuschließen.

Isoenzyme der Gruppe 1 werden von unterschiedlichen Gensequenzen kodiert und können daher manchmal erheblich in ihrer Primärstruktur differieren. Experimentell konnte eine mögliche Zugehörigkeit der Strictosidin-Synthase-Proteine zu dieser Kategorie bisher nicht eindeutig geklärt werden. Aufgrund der vollständigen immunologischen Kreuzreaktion muß allerdings ein hohes Maß an Übereinstimmung aller Formen bezüglich ihrer Tertiärstruktur gefordert werden. Falls die Strictosidin-Synthase-Enzyme unterschiedlichen genetischen Ursprungs sind, so sollten sie deshalb weitgehende Homologien in der Aminosäuresequenz aufweisen.

Innerhalb der Gruppe 4 werden schließlich alle Beispiele multipler Proteinformen zusammengefaßt, die sich durch post-synthetische Modifizierung von einer gemeinsamen Polypeptidkette ableiten. Dazu gehören u.a. Zymo-

gene (4 b) und konjugierte Proteine (4 a). Für die Einordnung der Strictosidin-Synthase-Proteine in die Kategorie 4 b fanden sich keine Hinweise. Qualitative Änderungen des elektrophoretischen Proteinverteilungsmusters während des Wachstums einer Zellkultur konnten genauso wenig wie Änderungen der molaren katalytischen Strictosidin-Synthase-Aktivität beobachtet werden. Alle Enzymformen werden somit durch de novo Synthese gebildet. Eine Umwandlung ineinander findet nicht statt. Positive experimentelle Befunde ergaben sich allein für eine Eingliederung der Strictosidin-Synthase-Enzyme in die Klasse 4 a. Alle Formen wurden nach Perjodatoxidation mit SCHIFF'schem Reagenz angefärbt, enthalten also konjugierte Kohlehydrate. Die leicht abweichende Intensitätsverteilung im elektrophoretisch aufgetrennten Strictosidin-Synthase-Bandenmuster beim direkten Vergleich eines mit SCHIFF'schem Reagenz und eines mit Amidoschwarz behandelten Polyacrylamidgeles (s. Abbildung 37) kann dabei als Hinweis auf mögliche Mikroheterogenitäten im Zuckerteil, ein Phänomen, das weit verbreitet unter Glykoproteinen ist (SHARON, 1974), interpretiert werden. Ebenfalls gestützt wird diese Klassifizierung durch einige molekulare Eigenschaften einzelner Formen. Die große Ähnlichkeit der Proteintertiärstruktur aller Enzyme wurde bereits ausdrücklich betont. Darüberhinaus konnten Molekulargewichtsunterschiede weder in der Gelfiltration noch in der hochauflösenden SDS-Elektrophorese gemessen werden. Als Ursache der Multiplizität wird daher die Modifizierung eines einheitlichen Translationsproduktes durch niedermolekulare Gruppen postuliert, wobei aber die Existenz mehrerer, möglicherweise durch Genamplifikation entstandener, kodierender Strictosidin-Synthase-Sequenzen nicht vollständig ausgeschlossen werden soll.

Nach den Richtlinien der IUPAC (1977) werden nur Proteine, die nachweislich in die Gruppen 1 - 3 einzu-

ordnen sind, zu den Isoenzymen gezählt. Für Proteine, bei denen die Ursache der Heterogenität ungeklärt bleibt und für alle Varianten, die erst nach dem Translationsprozeß durch Derivatisierung der Polypeptidkette entstehen, soll dagegen der Begriff "multiple Formen" verwendet werden. Diese Bezeichnung wird hier aufgrund der erläuterten Ergebnisse für die Beschreibung der Strictosidin-Synthase-Enzyme vorgeschlagen.

Glykoproteine wurden in den letzten Jahren in zunehmender Anzahl aus Tieren, Pflanzen, Mikroorganismen und Viren isoliert (SHARON, 1974). Über die biologischen Funktionen des Kohlehydratanteils gibt es bisher nur ungenaue Vorstellungen. Seit langem ist jedoch bekannt, daß konjugierte Zucker häufig die Tertiärstruktur der Polypeptidkette stabilisieren (SHARON, 1984). Diese veränderten physikalischen Eigenschaften glykosidierter Proteine können sich auch während der analytischen Charakterisierung bemerkbar machen. So werden bei der Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelfiltration oder elektrophoretische Methoden für Glykoproteine, deren Kohlehydratanteil mehr als 5% beträgt, in der Regel zu hohe Werte ermittelt (BETTELHEIM, 1977). Zurückzuführen ist dies auf eine größere Hydrathülle der modifizierten Polypeptidkette oder auf eine geringere SDS-Bindung pro Proteinmolekül.

Im Rahmen der Messung physikochemischer Eigenschaften der multiplen Strictosidin-Synthase-Formen ergaben sich mit diesen beiden Verfahren deutlich voneinander abweichende Resultate. Das in der SDS-Elektrophorese (10% Gele) bestimmte Molekulargewicht von 41 500 Dalton wird dabei als falsch beurteilt. Ebensowenig konnte aber durch die Erhöhung der Acrylamidkonzentration bis auf 17% (BETTELHEIM, 1977) eine Annäherung an niedrigere Werte erzielt werden. Allen Berechnungen der molaren katalytischen Strictosidin-Synthase-Aktivität wurde daher das durch Gelfiltration ermittelte, klei-

neren Molgewicht von 31 000 Dalton zugrunde gelegt. Nachdem der Glykoproteincharakter der Strictosidin-Synthase-Enzyme in der vorliegenden Arbeit entdeckt wurde, sollte jedoch auch dieser Wert in jedem Fall durch andere Methoden überprüft werden, die eine Bestimmung des Molekulargewichtes unabhängig von der Partikelform erlauben.

Die Voraussetzung für vergleichende Studien katalytischer Eigenschaften der multiplen Strictosidin-Synthase-Formen wurde durch die partielle, präparative Auftrennung an einer Chromatofokussiersäule in 4 diskrete Aktivitätsmaxima geschaffen. Nach elektrophoretischer Analyse umfaßt die isolierte Aktivität I dabei mindestens 1, die Aktivität II mindestens 3, die Aktivität III mindestens 1 und die Aktivität IV mindestens 2 Strictosidin-Synthase-Proteine. Im folgenden ist eine kurze Wertung der erzielten Ergebnisse aufgeführt.

In der pH-Abhängigkeit ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Formen, wobei das gemessene Optimum der Strictosidinbildung mit den beschriebenen Werten übereinstimmt (TREIMER und ZENK, 1979 b, MIZUKAMI et al., 1979). Das Ausmaß der thermischen Inaktivierung war ebenfalls für alle Aktivitäten gleich groß. Bei Tryptaminkonzentrationen > 1.5 mM zeigten die isolierten Enzyme ausgeprägte Substrathemmungen, wie bereits von TREIMER und ZENK (1979 b) dokumentiert.

Im Widerspruch zu den publizierten Arbeiten wurde für die Secologaninabhängigkeit aber eine positive Kooperativität gemessen. Die mit den einzelnen Enzymaktivitäten ermittelten Zahlenwerte wiesen dabei sowohl im Kooperativitätsgrad als auch in der MICHAELIS-MENTEN-Konstante und in der Substrathemmung für Tryptamin (s. Tabelle 3) Differenzen auf.

Obwohl ein unterschiedliches kinetisches Verhalten von Isoenzymen und multiplen Proteinformen in vitro häufig

diagnostiziert wird, konnte die Frage nach der physiologischen Bedeutung bisher nur selten beantwortet werden (MARKERT, 1975). Eine weiterführende Interpretation der für die multiplen Strictosidin-Synthase-Enzyme gesammelten Daten erscheint hier ebenfalls wenig sinnvoll. Ausdrücklich betont werden soll jedoch, daß alle Formen nebeneinander im Cytoplasma der Zelle vorliegen. Eine Kompartimentierung der Strictosidin-Synthase-Aktivität konnte durch Auftrennung von Zellorganellen auf Saccharosedichtegradienten nicht festgestellt werden. Ob und inwieweit die Heterogenität der Strictosidin-Synthase und das für die Substrate Tryptamin und Secologanin ermittelte kinetische Verhalten aller Enzymformen die Regulation der Indolalkaloidbiosynthese in C. roseus in vivo beeinflussen, muß zukünftigen Experimenten überlassen bleiben.

Kooperative Effekte der Enzymkatalyse werden in der biochemischen Literatur anhand von 3 allgemein akzeptierten Modellen erklärt. Die Vorstellungen von KOSHLAND und NEET (1968) und MONOD et al. (1965) gehen dabei von Proteinen mit mehreren Untereinheiten aus und werden aus diesem Grund für die Strictosidin-Synthase-Reaktion nicht in Erwägung gezogen. Ideen, die von AINSLIE et al. (1972) entwickelt wurden, basieren dagegen auf monomeren Enzymen. Im einfachsten Fall kann das Protein in 2 Konformationen mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften vorliegen, wobei die Umwandlung von einem Zustand in den anderen substratabhängig geschieht.

Neben der beobachteten positiven Kooperativität bei der Umsetzung von Secologanin und der Tatsache, daß die Strictosidin-Synthase nur aus einer Polypeptidkette besteht, wird dieses "slow-transition"-Modell durch konkrete Hinweise auf Konformationsänderungen der Proteintertiärstruktur gestützt. So wurde unter denaturierenden Bedingungen ein signifikanter Erhalt der En-

zymaktivität allein in Gegenwart von Secologanin, nicht aber von Tryptamin, gemessen. Die Experimente zur Substratspezifität zeigten darüberhinaus im LINEWEAVER-BURK-Diagramm in der Abhängigkeit von der Secologanin- und Dihydrosecologaninkonzentration einen positiven kooperativen Effekt, während 3'-O-Methylsecologanin zwar ebenfalls von der Strictosidin-Synthase metabolisiert wurde, aber die Umsatzrate in der doppelt reziproken Auftragung eine normale MICHAELIS-MENTEN-Kinetik mit leicht ausgeprägter negativer Kooperativität bei hohen Substratmengen aufwies. Dieses unterschiedliche kinetische Verhalten kommt den Annahmen des "slow-transition"-Modells sehr nahe und impliziert einen Konformationswechsel der Strictosidin-Synthase, der über die Glukose des Monoterpensubstrates vermittelt werden könnte.

Die Hypothese von AINSLIE *et al.* (1972) geht von nur einem aktiven Zentrum pro Proteinmolekül aus. Die Möglichkeit, daß die Strictosidin-Synthase mehrere Katalysezentren besitzt, die sich gegenseitig kooperativ beeinflussen, kann jedoch letztendlich hier nicht ausgeschlossen werden. Bei einem Molgewicht von nur 31 000 Dalton und mindestens 3 zu fordernden aktiven Zentren pro Enzym III ($n_H = 2.2$) wird dieser Fall aber als äußerst unwahrscheinlich erachtet. Eine Lösung des Problems wurde in Studien zum Enzymmechanismus gesucht. Die durchgeführten Experimente basierten dabei auf Vorstellungen, nach denen entweder Tryptamin oder Secologanin unter intermediärer Ausbildung einer SCHIFF'schen Base an die Strictosidin-Synthase gebunden werden könnten. Durch Inkubation mit den markierten Substraten und anschließender NaBH_4 -Reduktion konnte jedoch keine Radioaktivität im Protein fixiert werden. Damit bleiben die Fragen nach dem Mechanismus der Strictosidin-Synthase-Reaktion und der Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül zunächst unbeantwortet.

Neue Perspektiven in der Erforschung der Strictosidin-Synthase-Proteine eröffneten sich mit der Erzeugung monospezifischer Antiseren. So konnten die multiplen Formen nicht nur über ihre katalytische Aktivität, sondern auch in ihrer Eigenschaft als Proteinmoleküle erfaßt und die immunologische Identität im OUCHTERLONY-Test nachgewiesen werden. Die Isolation aus Proteinrohextrakten durch Immunadsorptionschromatographie und die Konjugation von Peroxidase an Strictosidin-Synthase-Antikörper zur Durchführung qualitativer Analysen hatten dabei wesentlichen Anteil an der endgültigen Aufklärung der Heterogenität des Enzyms aus *C. roseus*. Für quantitative Messungen des Strictosidin-Synthase-Proteingehaltes in ungereinigten Proteinextrakten wurde ein System der "Rocket"-Immunoelektrophorese ausgearbeitet und erfolgreich eingesetzt, um mögliche Änderungen der molaren katalytischen Enzymaktivität während des Zellwachstums diagnostizieren zu können. Als wertvolles quantitatives Verfahren erwies sich darüberhinaus die Entwicklung eines einfachen Testes, der auf einer Inaktivierung der Strictosidin-Synthase durch die Antikörper basiert. Die Hemmung der katalytischen Umsetzung in Gegenwart spezifischer γ -Globuline ist ein allgemein beobachtetes Phänomen und wird auf sterische Hinderungen durch die Bindung der Immunglobuline an das Enzymantigen zurückgeführt (BRANSTER und CINADER, 1961). Um die Empfindlichkeit der Messungen zu erhöhen, wurde die Neutralisation der Strictosidin-Synthase mit der Entfernung unlöslicher Antigen-/Antikörperkomplexe aus dem Reaktionsansatz verknüpft, da die Aggregatbildung allein bei Verwendung niedermolekularer Substrate nicht unbedingt eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt (CINADER, 1977). Alle gewonnenen Seren wurden unter denselben Bedingungen analysiert und es ergab sich in jedem Fall eine lineare Beziehung der Umsatzrate bei Werten zwischen 20%

bis 80% der maximal erreichbaren Enzymaktivität in Abhängigkeit von dem eingesetzten Antiserumvolumen. Der Test ist daher in der beschriebenen Durchführung für quantitative Bestimmungen sowohl der Antikörperkonzentration (bei konstanter Enzymaktivität) als auch des Strictosidin-Synthase-Proteingehaltes (bei konstanter Antiserummenge) einer unbekannten Lösung geeignet.

Anwendung fand die letztgenannte Variante bei der Abschätzung der Kreuzreaktion von Strictosidin-Synthase-Enzymen aus unterschiedlichen Pflanzenarten mit Anti-C. roseus-Strictosidin-Synthase-Immunglobulinen. Der Grad der immunologischen Kreuzreaktion zweier Proteine ist abhängig von der Anzahl gemeinsamer antigener Determinanten an der Moleküloberfläche und kann somit als ein Maß für die Ähnlichkeit der Proteintertiärstruktur aufgefaßt werden. In systematischen Studien konnte für einzelne Enzyme darüberhinaus gezeigt werden, daß eine zufriedenstellende Korrelation zwischen immunologischer Kreuzreaktion einerseits und Konservierung der Aminosäuresequenz andererseits besteht und jenes Kriterium daher als Hinweis auf phylogenetische Verwandtschaft bewertet werden kann (MARGOLIASH et al., 1970, PRAGER und WILSON, 1971).

Der in dieser Arbeit vorgestellte experimentelle Ansatz genügt solch weitreichenden Interpretationen sicherlich nicht. Zusammen mit den von TREIMER und ZENK (1979 a und b) ermittelten Daten ergeben sich aber bei Enzymen aus den Gattungen Catharanthus, Rhazia, Rauwolfia und Voacanga im Vergleich zu der Strictosidin-Synthase aus C. roseus auffallende Übereinstimmungen sowohl in katalytischen als auch in physikochemischen und strukturellen Eigenschaften. Hieraus wird eine weitgehende Homologie dieser Proteine abgeleitet, die nunmehr durch Immunadsorption mit C. roseus Strictosidin-Synthase-Antikörpern leicht isoliert und damit genaueren Untersuchungen zugeführt werden können.

Während die gegen C. roseus Strictosidin-Synthase gerichteten Immunglobuline ausnahmslos mit allen aus der Familie der Apocynaceae isolierten Enzymen reagierten, enthielten Indolalkaloid-haltige Vertreter der Rubiaceae zwar Strictosidin-Synthase-Aktivität, diese wurde jedoch nicht durch Zugabe der Antikörper gehemmt. Beide Pflanzenfamilien werden aufgrund morphologischer und phytochemischer Merkmale als direkte Nachkommen gemeinsamer Vorfahren in eine enge verwandtschaftliche Beziehung gesetzt (LEEUEWENBERG, 1980). Die fehlende immunologische Kreuzreaktion scheint daher zunächst ein überraschendes Ergebnis zu sein. Daß es sich aber bei den aus Rubiaceae und Apocynaceae extrahierten Strictosidin-Synthase-Aktivitäten um völlig verschiedene Proteine handelt, ist zweifelhaft. Nach allgemein akzeptierten Vorstellungen werden die Strukturen um das aktive Zentrum von Enzymen im Laufe der Evolution konserviert, während ein Aminosäureaustausch an der Moleküloberfläche häufiger auftritt (BLAKE und SWAN, 1971) und dadurch die Konformation antigener Determinanten ständig verändert werden kann. So zeigen z.B. natives Hühnereiweißlysozym und menschliches Lysozym keine immunologische Kreuzreaktion, obwohl eine Sequenzhomologie von 60% vorliegt und beide Proteine eine ähnliche Tertiärstruktur aufweisen (ARNHEIM et al., 1971). Darüberhinaus könnte eine mögliche Ursache der immunologischen Unterschiede zwischen den Strictosidin-Synthase-Enzymen aus Apocynaceae und Rubiaceae auch in dem Kohlehydratteil begründet liegen, da dieser, wie bereits erläutert, einen wesentlichen Einfluß auf die Konformation von Glykoproteinen hat.

Als Ergebnis dieser Arbeit werden mehrere Wege zur Reinigung der Strictosidin-Synthase-Proteine aus C. roseus vorgeschlagen. Durch Kombination unterschiedlicher physikochemischer Methoden wurden einzelne Enzymformen isoliert, deren Homogenität in der SDS-Elektrophorese

sowie durch die Erzeugung monospezifischer Antikörper nachgewiesen werden konnte und mittels Immunadsorptionschromatographie gelang die Darstellung sämtlicher Strictosidin-Synthase-Proteine in hochangereinigter Form, wobei sich nach elektrophoretischer Auftrennung 7 Enzymbanden anfärbten. Mit den geschilderten Verfahren ist nunmehr die Gewinnung reiner Enzympräparationen, auch aus anderen Apocynaceae-Arten, problemlos möglich.

Die aus C. roseus isolierten multiplen Strictosidin-Synthase-Formen unterscheiden sich nicht in ihrem Molekulargewicht, weisen aber verschiedene isoelektrische Punkte auf und sind durch einen Kohlehydratteil modifiziert. Die molare katalytische Aktivität wurde zu 3.2 s^{-1} für das homogene Hauptenzym und zu 3.5 s^{-1} für die Summe aller Aktivitäten im Proteinrohextrakt durch "Rocket"-Immunelektrophorese bestimmt. Dieser Wert entspricht der Umsatzzahl der Strictosidin-Synthase, falls nur ein katalytisches Zentrum pro Proteinmolekül vorliegt.

Konkrete Ansatzpunkte für proteinchemische Untersuchungen der Strictosidin-Synthase wurden hier insbesondere mit der Entdeckung der Multiplizität des Enzyms aus C. roseus und seines Glykoproteincharakters geschaffen. Im Vordergrund dürften dabei zunächst die Fragen stehen, inwieweit die beobachteten Ladungsdifferenzen und Heterogenitäten auf den Kohlehydratteil zurückzuführen sind sowie eine Klärung, ob konjugierte Zucker für die Enzymaktivität und für die Erkennung des Proteins durch die gewonnenen Antikörper notwendig sind. Erst wenn diese Probleme zufriedenstellend gelöst sind, sollte eine Klonierung des Strictosidin-Synthase-Genes, wie es auf Sekundärstoffebene für Enzyme der Flavonoidbiosynthese bereits beschrieben wurde (KREUZALER et al., 1983), in Angriff genommen werden, um die Primärstruktur der Polypeptidkette aus der cDNA-

Sequenz ableiten zu können und möglicherweise dieses Gen in Prokaryonten zur Expression zu bringen.

Die katalytischen Eigenschaften der Strictosidin-Synthase als Biokatalysator in vitro wurden durch Immobilisierung einer partiell angereicherten Enzympräparation, die frei von Strictosidin-spezifischer β -Glukosidase-Aktivität war, an CNBr-aktivierte Sepharose überprüft (PFITZNER und ZENK, 1982). Als besonders vorteilhaft stellte sich dabei die deutlich gesteigerte Thermostabilität des fixierten Enzyms (Halbwertszeit 68 Tage) gegenüber der löslichen Strictosidin-Synthase (Halbwertszeit 5 Stunden) heraus. Dieses Verhalten immobilisierter Enzyme wird häufig beobachtet (CHIBATA, 1978) und kann auf eine Stabilisierung der aktiven Konformation des Proteins durch Mehrfachbindung an den Träger zurückgeführt werden (MARTINEK et al., 1977). In einem Durchflußverfahren wurden insgesamt 6 g stereochemisch reines Strictosidin erzeugt, wobei die Produktionsrate allein von der Verfügbarkeit der Vorstufe Secologanin, das sich ebenfalls aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel ableitet, limitiert wurde. Das zentrale Intermediat der monoterpenoiden Indolalkaloide in höheren Pflanzen kann somit in einem einfachen Verfahren synthetisiert werden und ist jetzt für Derivatisierungen zur Gewinnung pharmazeutisch interessanter Substanzen in unbegrenzter Menge zugänglich.

In ersten Versuchen zur Biotransformation von Strictosidin durch C. roseus Zellsuspensionskulturen wurde diese Verbindung zu 43% in unterschiedliche Alkaloide eingebaut. Dazu gehören Substanzen, die in vitro nur in Gegenwart von Co-Substraten gebildet werden, solche, deren Synthese bisher unter zellfreien Bedingungen nicht gelang und Spurenalkaloide, die in vivo nur in geringsten Mengen vorliegen. Durch Einsatz einer nahen Vorstufe wurde hier zunächst das biochemische Poten-

tial der Kultur überprüft. Mit Hilfe der Zellimmobilisierung, die von BRODELIUS et al. (1979) und ALFERMANN et al. (1980) bereits erfolgreich auf pflanzliche Suspensionskulturen angewendet wurde, sollte die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf ein technisch verbessertes Verfahren untersucht werden. Hierzu wurden Zellen, die mit Dimethylsulfoxid permeabilisiert waren, in Ca-Alginat nach der von FELIX et al. (1981) und BRODELIUS und NILSSON (1983) für C. roseus vorgeschlagenen Methode eingeschlossen. Die Behandlung mit Dimethylsulfoxid führte jedoch zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensfähigkeit dieser Zellen und gleichzeitig zu einem Verlust der Alkaloidbildung. In zukünftigen Studien sollte daher die Suche nach schonenderen Techniken, die auch für eine Anwendung auf C. roseus Suspensionskulturen geeignet sind, im Vordergrund stehen, um weitere Fortschritte bei der Synthese komplexer Sekundärmetaboliten erzielen zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden einführende Versuche vorgestellt, die neue Ansatzpunkte zur Gewinnung von Naturstoffen aus pflanzlichen Zellkulturen ermöglichen könnten. War es in den zurückliegenden Jahren das Ziel, stabile Zelllinien mit hohen Ertragsraten zu züchten, so wurde hier das zentrale Enzym eines Biosyntheseweges eingehend studiert mit dem Ausblick, diesen wichtigen Teilschritt in Zukunft möglicherweise beeinflussen und das biochemische Potential von Organismen durch eine gezielte Einschleusung von Vorstufen in den Stoffwechsel nutzen zu können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Strictosidin-Synthase aus Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen bis zur Homogenität zu reinigen und die Eignung dieses Enzyms als Biokatalysator in vitro zu überprüfen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt.

1. Die Strictosidin-Synthase wurde durch variiierende Kombinationen physikochemischer Proteinreinigungstechniken angereichert. Methoden, denen das Prinzip der Auftrennung eines Gemisches nach den isoelektrischen Punkten seiner einzelnen Komponenten zugrunde liegt, wie Chromatofokussierung, Polyacrylamidgелеlektrophorese oder isoelektrische Fokussierung, führten dabei zum Nachweis mehrerer Enzymaktivitäten. Durch Chromatofokussierung konnten präparativ 4 Strictosidin-Synthase-Aktivitäten mit den isoelektrischen Punkten 4.8, 4.6, 4.5 und 4.3 isoliert werden. Diese multiplen Formen sind nicht auf Dissoziation, Assoziation, Proteolyse während der Aufarbeitung oder Wechselwirkungen mit den verwendeten Trägermaterialien zurückzuführen und treten unabhängig vom Reduktions- oder Oxidationszustand des umgebenden Milieus auf. Ihr Vorliegen in vivo wird daher als erwiesen erachtet.
2. Das Hauptenzym (51% der Gesamtaktivität) wurde durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (35 - 50%) des Proteinrohextraktes, Gelfiltration an Aca 44, hydrophobe Chromatographie an Matrex Gel Red A, Chromatofokussierung und semi-präparative Polyacrylamidgелеlektrophorese bis zur Homogenität 1292 fach angereichert. Die spezifische Aktivität betrug $104.7 \text{ nkat/mg Protein}$, die molare katalytische Aktivität 3.2 s^{-1} .

3. Ein Vergleich katalytischer und physikochemischer Eigenschaften der 4 durch Chromatofokussierung isolierten Strictosidin-Synthase-Aktivitäten ergab weitgehende Übereinstimmungen. Unterschiede im pH-Optimum (pH 6.7) und in der Thermostabilität konnten nicht gemessen werden. Alle Aktivitäten zeigten mit Tryptaminkonzentrationen > 1.5 mM eine ausgeprägte Substrathemmung. Die K_m -Werte für dieses Substrat betrugen 0.9 mM (Enzym I), 6.6 mM (Enzym II), 1.9 mM (Enzym III) bzw. 2.2 mM (Enzym IV). Bei der Aufnahme der Secologaninabhängigkeit wurde eine positive Kooperativität der Strictosidin-Synthase-Enzyme beobachtet. Die errechneten HILL-Koeffizienten liegen zwischen $n_H = 1.3$ (Enzym I) und $n_H = 2.2$ (Enzym III). Als Ursache wird eine Konformationsänderung der Strictosidin-Synthase-Proteine durch die Bindung des Substrates nach dem Modell von AINSLIE et al. (1972) diskutiert. Die kinetischen Messungen wurden durch die Stabilisierung der Enzymaktivität unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Secologanin bestätigt. Darüberhinaus wurde für die Abhängigkeit von der Dihydrosecologaninkonzentration ebenfalls ein positiver kooperativer Effekt gemessen, während 3'-O-Methylsecologanin bei niedrigen Substratmengen mit normaler MICHAELIS-MENTEN-Kinetik umgesetzt wird. Secologaninsäure und Tryptaminderivate, die in 1'-Stellung und am aromatischen Ringsystem mehrfach mit Methyl- und/oder Methoxygruppen substituiert sind und solche Derivate, die nur am Aromaten entsprechend modifiziert sind, werden nicht metabolisiert. Alle Strictosidin-Synthase-Proteine liegen als Monomer vor. Das Molekulargewicht der multiplen Formen wurde durch Gelfiltration eines Proteinrohextraktes zu 31 000 Dalton $\pm 10\%$ bestimmt. Für die homogene Hauptaktivität errechnete sich aus der SDS-Elektrophorese ein Wert von 41 500 Dalton $\pm 5\%$. Weder

Tryptamin noch Secologanin werden unter intermediärer Ausbildung einer SCHIFF'schen Base an die Strictosidin-Synthase-Proteine gebunden.

4. Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen sowohl mit einzeln isolierten, homogenen Enzymformen als auch mit einer partiell angereicherten Präparation, die sämtliche Strictosidin-Synthase-Proteine enthielt, immunisiert. Der Nachweis spezifisch gebildeter γ -Globuline wurde durch Neutralisation der Enzymaktivität und durch Präzipitatbildung in Agarosegelen erbracht. Antikörper, die nur gegen eine Enzymform gerichtet waren, zeigten dabei vollständige immunologische Kreuzreaktion mit allen übrigen Proteinen. Die Seren der mit partiell angereicherten Strictosidin-Synthase-Präparationen immunisierten Tiere wurden durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Enzym von verunreinigenden Immunglobulinen befreit.
5. Die gemeinsame Anreicherung aller Enzymformen wurde ausgehend von Proteinrohextrakten durch Immunadsorption an affinitätsgereinigten Strictosidin-Synthase-Antikörpern erzielt. Dabei wurden aus Zellsuspensionskulturen (Anreicherung 1063 fach, spezifische Aktivität 74.4 nkat/mg Protein) und aus einer intakten Pflanze (Anreicherung 1780 fach, spezifische Aktivität 71.2 nkat/mg Protein) zu mehr als 95% reine Enzympräparationen isoliert. Sowohl durch Auftrennung in Polyacrylamidgelen und Behandlung mit einem Proteinreagenz als auch durch Auftrennung in der isoelektrischen Fokussierung und anschließender Detektion mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Strictosidin-Synthase-Immunglobulinen konnte nachgewiesen werden, daß in C. roseus 7 heterogene Strictosidin-Synthase-Formen vorliegen. In der SDS-Gelelektrophorese konnten diese Enzymbanden jedoch nicht aufge-

löst werden. Die multiplen Formen der Strictosidin-Synthase sind somit immunologisch identisch, unterscheiden sich nicht in ihrem Molekulargewicht, tragen aber unterschiedliche Ladungen. Zu ihrer quantitativen Bestimmung in Proteinrohextrakten wurde ein System der "Rocket"-Immunelektrophorese etabliert.

6. Die Heterogenität der Strictosidin-Synthase ist nicht auf unterschiedliche Konformationszustände einzelner Enzymformen zurückzuführen, sondern vielmehr pH- und temperaturstabil. Eine Änderung der molaren katalytischen Aktivität oder eine Umwandlung der Proteinformen ineinander während des Wachstums einer Zellkultur findet nicht statt. Ebenso wenig ergaben sich nach Auftrennung von Zellorganellen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation Hinweise auf eine subzelluläre Kompartimentierung. Alle Enzyme reagieren allerdings nach Perjodatoxidation positiv mit SCHIFF'schem Reagenz, es handelt sich also um Glykoproteine. Als Ursache der beobachteten Multiplizität müssen daher zunächst Unterschiede im Kohlehydratteil der Strictosidin-Synthase-Proteine in Erwägung gezogen werden. Die bei der Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelfiltration und SDS-Elektrophorese auftretenden Differenzen werden ebenfalls auf die Modifizierung der Polypeptidkette durch konjugierte Zucker zurückgeführt.
7. Strictosidin-Synthase-Aktivität konnte bei Indolalkaloid-haltigen Vertretern der Pflanzenfamilie der Apocynaceae und der Rubiaceae nachgewiesen werden. Die gegen das Enzym aus C. roseus (Apocynaceae) gerichteten Antikörper reagierten jedoch ausschließlich mit den Proteinen anderer Apocynaceae-Arten, während mit Strictosidin-Synthase-Aktivitäten aus Rubiaceae keine Kreuzreaktion festzustellen war. Die beste Kreuzreaktion (> 45%) wurde mit Enzym aus

C. longifolius gemessen.

8. Zur kontinuierlichen Synthese des Enzymproduktes wurde eine partiell angereicherte, Strictosidin- β -Glukosidase-freie Strictosidin-Synthase-Präparation unter 40% igem Erhalt der katalytischen Aktivität an CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert. Als besonders vorteilhaft erwies sich dabei die gesteigerte Thermostabilität des gebundenen Enzyms (Halbwertszeit 68 Tage) verglichen mit einer Halbwertszeit von nur ca. 5 Stunden für die lösliche Strictosidin-Synthase unter Standardtestbedingungen (37°C). Während einer 12 tägigen Inkubationsdauer wurden insgesamt 6 g stereochemisch reines Strictosidin gewonnen, dessen Identität durch chemische und physikalische Methoden bestätigt wurde. Das trägerfixierte Enzym zeigte nach 3 jähriger Lagerzeit bei 4°C in Anwesenheit von 0.02% NaN₃ keine signifikanten Aktivitätsverluste.
9. Die Fütterung von Strictosidin an C. roseus Zellsuspensionskulturen bewirkte eine deutliche Erhöhung des Sekundärstoffgehaltes, der in Kontrollextrakten bei den gewählten Bedingungen unterhalb der Nachweisgrenze lag. Nach Biotransformation dieser Vorstufe wurden 6 unterschiedliche Indolalkaloide isoliert und durch spektroskopische Methoden charakterisiert. Die Einbaurate betrug 43% bei einer Substanzzugabe von 10 mg Strictosidin pro 5 g Zellgewebe (FG) und einer Inkubationszeit von 48 h.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AHLERS, J., ARNOLD, A., VON DÖHREN, R., PETER, H.W.:
Enzymkinetik. G.Fischer Verl. Stuttgart, New
York 1982
- AINSLIE, G.R., SHILL, J.P., NEET, K.E.: Transients
and Cooperativity. A Slow Transition Model for
for Relating Transients and Cooperative Kinetics
of Enzymes.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 7088-7096.
- ALFERMANN, A.W., SCHULLER, I., REINHARD, E.: Biotrans-
formation of Cardiac Glycosides by Immobilized
Cells of *Digitalis lanata*.
Planta medica 40 (1980) 218-223.
- ANDREWS, P.: Estimation of the Molecular Weight of
Proteins by Sephadex Gelfiltration.
Biochem. J. 91 (1964) 222-233.
- ANDREWS, P.: The Gelfiltration Behaviour of Proteins
Related to their Molecular Weight over a Wide
Range.
Biochem. J. 96 (1965) 595-606.
- ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., ZENK, M.H.:
Radioimmunoassays for the Determination of the
Indole Alkaloids Ajmalicine and Serpentine in
Plants.
Planta medica 34 (1978) 37-46.
- ARGOS, P., ROSSMANN, M.G., GRAU, U.M., ZUBER, H.,
FRANK, G., TRATSCHIN, J.D.: Thermal Stability
and Protein Structure.
Biochemistry 18 (1979) 5698-5703.
- ARNHEIM, N., SOBEL, J., CANFIELD, R.: Immunochemical
Resemblance between Human Leukemia and Hen Egg-
white Lysozyme and their Reduced Carboxymethyl
Derivatives.
J. Mol. Biol. 61 (1971) 237-250.
- AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S.: Chemical Coupling
of Peptides and Proteins to Polysaccharides by
Means of Cyanogen Halides.
Nature 214 (1967) 1302-1304.
- BATTERSBY, A.R., BROWN, R.T., KAPIL, R.S., MARTIN, J.A.,
PLUNKETT, A.O.: Role of Loganin in the Bio-
synthesis of Indole Alkaloids.
Chem. Commun. (1966) 812-813.

- BATTERSBY, A.R., BURNETT, A.R., PARSONS, P.G.: Partial Synthesis and Isolation of Vincoside and Isovincoside: Biosynthesis of the Three Major Classes of Indole Alkaloids from the β -Carboline System. Chem. Commun. (1968 a) 1282-1284.
- BATTERSBY, A.R., BURNETT, A.R., PARSONS, P.G.: Preparation of Secologanin: Its Conversion into Ipecoside and Its Role in Indole Alkaloid Biosynthesis. Chem. Commun. (1968 c) 1280-1281.
- BATTERSBY, A.R., KAPIL, R.S., MARTIN, J.A., MO, L.: Loganin as Precursor of the Indole Alkaloids. Chem. Commun. (1968 b) 133-134.
- BATTERSBY, A.R., BURNETT, A.R., PARSONS, P.G.: Alkaloid Biosynthesis. Part XV. Partial Synthesis and Isolation of Vincoside and Isovincoside: Biosynthesis of the Three Major Classes of Indole Alkaloids from Vincoside. J. Chem. Soc. (C) (1969 a) 1193-1200.
- BATTERSBY, A.R., BURNETT, A.R., PARSONS, P.G.: Alkaloid Biosynthesis. Part XIV. Secologanin: Its Conversion into Ipecoside and Its Role as Biological Precursor of the Indole Alkaloids. J. Chem. Soc. (C) (1969 b) 1187-1192.
- BATTERSBY, A.R., GIBSON, K.H.: Further Studies on Rearrangements during Biosynthesis of Indole Alkaloids. Chem. Commun. (1971) 902-904.
- BETTELHEIM, F.A.: Molecular Weight Determination and Physical Properties. In: The Glycoconjugates Vol. I. Horowitz, M.I., Pigman, W. (eds.) Academic Press London, New York 1977
- BLACKSTOCK, W.P., BROWN, R.T., LEE, G.K.: Configuration at C-3 in Vincoside. Chem. Commun. (1971) 910-911.
- BLAKE, C.C.F., SWAN, I.D.A.: X-Ray Analysis of the Structure of Human Lysozyme at 6 Å Resolution. Nature, New Biology 232 (1971) 12-15.
- BRADFORD, M.: A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-Binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

- BRANSTER, M., CINADER, B.: The Interaction between Bovine Ribonuclease and Antibody: A Study of the Mechanism of Enzyme Inhibition by Antibody. *J. Immunol.* 87 (1961) 18-38.
- BREIDENBACH, R.W., BEEVERS, H.: Association of the Glyoxylate Cycle Enzymes in a Novel Subcellular Particle from Castor Bean Endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 462-469.
- BREWER, J.M.: Artifact Produced in Disc Electrophoresis by Ammonium Persulfate. *Science* 156 (1967) 256-257.
- BRODELIUS, P., DEUS, B., MOSBACH, K., ZENK, M.H.: Immobilized Plant Cells for the Production and Transformation of Natural Products. *FEBS Lett.* 103 (1979) 93-97.
- BRODELIUS, P., NILSSON, K.: Permeabilization of Immobilized Plant Cells, Resulting in Release of Intracellularly Stored Products with Preserved Cell Viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 (1983) 275-280.
- BROWN, R.T., SMITH, G.N., STAPELFORD, K.S.J.: The Biosynthesis of Strictosidine. *Tetrahedron Lett.* 41 (1968) 4349.
- BROWN, R.T., LEONARD, J., SLEIGH, S K.: The Role of Strictosidine in Monoterpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis. *Phytochem.* 17 (1978) 899-900.
- BROWN, R.T.: Biomimetic Conversion of Secologanin into Alkaloids. In: *Indole and Biogenetically Related Alkaloids*. Phillipson, J.D., Zenk, M.H. (eds.) Academic Press London, New York 1980
- BUNN, H.F., FORGET, B.G., RANNEY, H.M.: *Human Hemoglobins*. W.B.Saunders Company Philadelphia, London, Toronto 1977
- CHIBATA, I.: *Immobilized Enzymes*. Wiley New York 1978
- CINADER, B.: Enzyme-Antibody Interactions. In: *Methods in Immunology and Immunochemistry Vol. IV*. Williams, C.A., Chase, M.W. (eds.) Academic Press New York, San Francisco, London 1977

- CUATRECASAS, P., ANFENSEN, C.B.: Affinity Chromatography.
Ann. Rev. Biochem. 40 (1971) 259-279.
- DAVIS, B.J.: Disk Electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 404-427.
- DELBRÜCK, A., ZEBE, E., BÜCHER, Th.: Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung.
Biochemische Zeitschrift 331 (1959) 273-296.
- DE SILVA, K.T.D., SMITH, G.N., WARREN, K.E.H.: Stereochemistry of Strictosidine.
Chem. Commun. (1971) 905-907.
- DEUS, B.: Stoffwechselleistungen varianter Stämme pflanzlicher Zellkulturen.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1980
- FAHRNEY, D.E., GOLD, A.M.: Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholin-Esterase, α -Chymotrypsin and Trypsin.
J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 997-1000.
- FELGENHAUER, K.: Quantitation and Specific Detection Methods after Disk Electrophoresis of Serum Proteins.
Clin. Chim. Acta 27 (1970) 305-312.
- FELIX, H., BRODELIUS, P., MOSBACH, K.: Enzyme Activities of the Primary and Secondary Metabolism of Simultaneously Permeabilized and Immobilized Plant Cells.
Anal. Biochem. 116 (1981) 462-470.
- GABETTA, B., MUSTICH, G.: Spectral Data of Indole Alkaloids. Invernì Della Beffa Mailand 1975
- GAMBORG, O.L., MÜLLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells.
Exp. Cell Res. 50 (1968) 151-158.
- GILBERT, H.F., O'LEARY, M.H.: Modification of Arginine and Lysine in Proteins with 2,4-Pentanedione.
Biochemistry 14 (1975) 5194-5199.

- GRABAR, P., WILLIAMS, C.A.: Methode Permettant l'Etude Conjuguee des Proprietes Electrophoretiques et Immunochimiques d'un Melange de Proteines. Application au Serum Sanguin. Biochim. Biophys. Acta 10 (1953) 193-194.
- GROSSBARD, L., SCHIMKE, R.T.: Multiple Hexokinases of Rat Tissues. Purification and Comparison of Soluble Forms. J. Biol. Chem. 241 (1966) 3546-3560.
- HARBOE, N., INGILD, A.: Immunization, Isolation of Immunglobulins, Estimation of Antibody Titre. In: A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis. Scand. J. Immunol. 2, Suppl. 1. Axelsen, N.H., Krøll, J., Weeke, B. (eds.) Universitetsforlaget Oslo 1973
- HARTMAN, B.K., UDENFRIEND, S.: A Method for Immediate Visualization of Proteins in Acrylamide Gels and Its Use for Preparation of Antibodies to Enzymes. Anal. Biochem. 30 (1969) 391-394.
- HEMSCHIEDT, T., ZENK, M.H.: Glucosidases Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis of Catharanthus Cell Cultures. FEBS Lett. 110 (1980) 187-191.
- HEMSCHIEDT, T.: Bildung und Umsetzung von Iminium-Cathenamin, katalysiert durch spezifische Enzyme aus Catharanthus roseus. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1983
- HUNTER, R.L., MARKERT, C.L.: Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. Science 125 (1957) 1294-1295.
- INOUE, H.: New Results on the Biosynthesis of Iridoid Glucosides. Planta medica 33 (1978) 193-216.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN): Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes, Recommendations (1976). J. Biol. Chem. 252 (1977) 5939-5941.
- KENNARD, O., ROBERTS, P.J., ISAACS, N.W., ALLEN, F.H., MOTHERWELL, W.D.S., GIBSON, K.H., BATTERSBY, A.R.: X-Ray Determination of the Structure of OO-Dimethylipicoside. Chem. Commun. (1971) 899-900.

- KLÜSENER, K.-H.: Verbreitung, Isolierung und Eigenschaften von Loganin-Derivaten in höheren Pflanzen.
Staatsexamensarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1976
- KOHN, J., WILCHEK, M.: Procedures for the Analysis of Cyanogen Bromide-Activated Sepharose or Sephadex by Quantitative Determination of Cyanate Esters and Imidocarbonates.
Anal. Biochem. 115 (1981) 375-382.
- KOSHLAND, D.E., NEET, K.E.: The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes.
Ann. Rev. Biochem. 37 (1968) 359-410.
- KREUZALER, F., RAGG, H., FAUTZ, E., KUHN, D.N.,
HAHLBROCK, K.: UV-Induction of Chalcone Synthase mRNA in Cell Suspension Cultures of Petroselinum hortense.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 2591-2593.
- KUTNEY, J.P., CRETNEY, W.J., HADFIELD, J.R., HALL, E.S.,
NELSON, V.R., WIGFIELD, D.C.: Studies on Indole Alkaloid Biosynthesis.
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 3566-3567.
- LAURELL, C.-B.: Antigen-Antibody Crossed Electrophoresis.
Anal. Biochem. 10 (1965) 358-361.
- LAURELL, C.-B.: Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies.
Anal. Biochem. 15 (1966) 45-52.
- LEETE, E.: Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids. I. The Incorporation of Tryptophan into Ajmaline.
J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 6338-6342.
- LEETE, E.: Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids. II. The Incorporation of Tryptophan into Serpentine and Reserpine.
Tetrahedron 14 (1961) 35-41.
- LEEUWENBERG, A.J.M.: The Taxonomic Position of Some Genera in the Loganiaceae, Apocynaceae, and Rubiaceae, Related Families which Contain Indole Alkaloids. In: Indole and Biogenetically Related Alkaloids. Phillipson, J.D., Zenk, M.H. (eds.) Academic Press London, New York 1980
- LERMAN, L.S.: A Biochemically Specific Method for Enzyme Isolation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39 (1953) 232-236.

- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 110-125.
- LOEW, P., ARIGONI, D.: The Biological Conversion of Loganin into Indole Alkaloids. *Chem. Commun.* (1968) 137-138..
- MARGOLIASH, E., NISONOFF, A., REICHLIN, M.: Immunological Activities of Cytochrom c. I. Precipitating Antibodies to Monomeric Vertebrate Cytochromes c. *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 931-939.
- MARKERT, C.L., WHITT, G.S.: Molecular Varieties of Isozymes. *Experientia* 24 (1968) 977-991.
- MARKERT, C.L.: Biology of Isozymes. In: Isozymes. I. Molecular Structure. Markert, C.L. (ed.) Academic Press New York, San Francisco, London 1975
- MARTINEK, K., KLIBANOV, A.M., GOLDMACHER, V.S., BEREZIN, I.V.: The Principles of Enzyme Stabilization. I. Increase of Thermostability of Enzymes Covalently Bound to a Complementary Surface of a Polymer Support in a Multipoint Fashion. *Biochim. Biophys. Acta* 485 (1977) 1-12.
- MAURER, H.R.: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter Berlin, New York 1971
- MEISTER, A.: Reduction of α,γ -Diketo- and α -Ketoacids Catalyzed by Muscle Preparations and by Crystalline Lactic Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 184 (1950) 117-129.
- MILLER, R.E., VARSENIG, Z.P., SEVAG, M.G.: Inhibitors of Yeast Hexokinase by Homologous Antiserum. *J. Bact.* 58 (1949) 621-625.
- MIZUKAMI, H., NORDLÖV, H., LEE, S.-L., SCOTT, A.I.: Purification and Properties of Strictosidine Synthetase (an Enzyme Condensing Tryptamine and Secologanin) from Catharanthus roseus Cultured Cells. *Biochemistry* 18 (1979) 3760-3763.
- MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J.P.: On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88-118.

- NAGAKURA, N., RÜFFER, M., ZENK, M.H.: The Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I (1979) 2308-2312.
- NAKANE, P.K., PIERCE, G.B.: Enzyme-Labelled Antibodies: Preparation and Application for the Localization of Antigens.
J. Histochem. Cytochem. 14 (1966) 929-931.
- NANDI, D.L., SHEMIN, D.: δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase of Rhodopseudomonas spheroides. III. Mechanism of Porphobilinogen Synthesis.
J. Biol. Chem. 243 (1968) 1236-1242.
- O'SULLIVAN, C., TOMPSON, F.W.: Invertase: A Contribution to the History of an Enzyme or Unorganized Ferment.
J. Chem. Soc. 57 (1890) 834-931.
- OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-Gel Methods for Immunological Analysis.
Progr. in Allergy 5 (1958) 1-78.
- ODIN, J.: Method of Immunochemical Analysis by Specific Precipitation in Gelled Medium.
Compt. rend. 222 (1946) 115-116.
- PETERSON, D.H., MURRAY, H.C., EPPSTEIN, S.H., REINEKE, L.M., WEINTRAUB, A., MEISTER, P.D., LEIGH, H.M.: Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone.
J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 5933-5936.
- PETERSON, E.A., SOBER, H.A.: Chromatography of Proteins. I. Cellulose Ion-Exchange Adsorbents.
J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 751-755.
- PFITZNER, A.: Die Biosynthese der Rauwolfia-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1984
- PFITZNER, U., ZENK, M.H.: Immobilization of Strictosidine-Synthase from Catharanthus Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine.
Planta medica 46 (1982) 10-14.
- PORATH, J., AXEN, R., ERNBACK, S.: Chemical Coupling of Proteins to Agarose.
Nature 215 (1967) 1491-1492.

- PRAGER, E.M., WILSON, A.C.: The Dependence of Immunological Cross-Reactivity upon Sequence Resemblance among Lysozymes. I. Micro-Complement Fixation Studies.
J. Biol. Chem. 246 (1971) 5978-5989.
- RECSEI, P.A., SNELL, E.E.: Histidin Decarboxylase of Lactobacillus 3o a. VI. Mechanism of Action and Kinetic Properties.
Biochemistry 9 (1970) 1492-1497.
- REINHARD, E., BOY, M., KAISER, F.: Umwandlung von Digitalis-Glykosiden durch Zellsuspensionskulturen.
Planta medica Suppl. (1975) 161-168.
- RIGHETTI, P.G., DRYSDALE, J.W.: Isoelectric Focusing. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 5, Part II. Work, T.S., Work, E. (eds.) North Holland Publishing Co. Amsterdam, Oxford 1976
- RÜFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Strictosidine, the Common Precursor for Monoterpenoid Indole Alkaloids with 3 α and 3 β Configuration.
Tetrahedron Lett. 18 (1978) 1593-1596.
- SASAKI, M., IIDA, S., MURACHI, T.: The Mechanism of Inhibition of Stem Bromelain by Its Specific Antibody.
J. Biochem. 73 (1973) 367-375.
- SASAKI, R., SUGIMOTO, E., CHIBA, H.: Yeast Phosphoglyceric Acid Mutase-Modifying Enzyme.
Arch. Biochem. Biophys. 115 (1966) 53-61.
- SCOTT, A.I., LEE, S.-L.: Biosynthesis of Indole Alkaloids. A Cell-Free System of Catharanthus roseus.
J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 6906-6908.
- SCOTT, A.I., LEE, S.-L., DE CAPITE, P., CULVER, M.G., HUTCHINSON, C.R.: The Role of Isovincoside (Strictosidine) in the Biosynthesis of the Indole Alkaloids.
Heterocycles 7 (1977) 979-984.
- SCOTT, A.I., LEE, S.-L., WAN, W.: Indole Alkaloid Biosynthesis: Partial Purification of "Ajmalicine Synthetase" from Catharanthus roseus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75 (1977 a) 1004-1009.

- SEIPEL, U.: Untersuchungen zur Bildung der Strictosidin-Synthase in Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1979
- SHARON, N.: Glycoproteins.
Sci. American 230 (1974) 78-86.
- SHARON, N.: Glycoproteins.
TIBS 9 (1984) 198-202.
- SLUYTERMAN, L.A.AE., ELGERSMA, O.: Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on Ion Exchange-Columns.
I. General Principles.
J. Chromatogr. 150 (1978) 17-30.
- SMITH, G.N.: Strictosidine: A Key Intermediate in the Biogenesis of Indole Alkaloids.
Chem. Commun. (1968) 912-914.
- SOUZU, I., MITSUHASHI, H.: Structures of Iridoids from Lonicera morrowii A.Gray II.
Tetrahedron Lett. 2 (1970) 191-192.
- STÖCKIGT, J., TREIMER, J., ZENK, M.H.: Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids by Cell Free Extracts of Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures.
FEBS Lett. 70 (1976) 267-270.
- STÖCKIGT, J., HUSSON, H.P., KAN-FAN, C., ZENK, M.H.: Cathenamine, a Central Intermediate in the Cell Free Biosynthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids.
Chem. Commun. (1977) 164-166.
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Isovincoside (Strictosidine), the Key Intermediate in the Enzymatic Formation of Indole Alkaloids.
FEBS Lett. 79 (1977 a) 233-237.
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Strictosidine (Isovincoside): the Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpene Indole Alkaloids.
Chem. Commun. (1977 b) 646-648.
- STÖCKIGT, J.: Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine.
Phytochem. 18 (1979) 965-971.

- STÖCKIGT, J.: The Biosynthesis of Heteroyohimbine-Type Alkaloids. In: Indole and Biogenetically Related Alkaloids. Phillipson, J.D., Zenk, M.H. (eds.) Academic Press London, New York 1980
- STÖCKIGT, J., SOLL, H.J.: Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus and C. ovalis. Planta medica 40 (1980) 22-30.
- THOMAS, R.: A Possible Biosynthetic Relationship between the Cyclopentanoid Monoterpenes and the Indole Alkaloids. Tetrahedron Lett. 16 (1961) 544-553.
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Enzymic Synthesis of Corynanthe-Type Alkaloids in Cell Cultures of Catharanthus roseus: Quantitation by Radioimmunoassay. Phytochem. 17 (1978) 227-231.
- TREIMER, J.F.: Die Strictosidin-Synthase aus pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1979
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Strictosidine-Synthase from Cell Cultures of Apocynaceae Plants. FEBS Lett. 97 (1979 a) 159-162.
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Purification and Properties of Strictosidine-Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. Eur. J. Biochem. 101 (1979 b) 225-233.
- ULBRICH, B., ZENK, M.H.: Partial Purification of Hydroxycinnamoyl-CoA:Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase from Higher Plants. Phytochem. 18 (1979) 929-933.
- VALLEE, B.L., RIORDAN, J.F.: Chemical Approaches to the Properties of Active Sites of Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 38 (1969) 733-794.
- WARREN, S., ZERNER, B., WESTHEIMER, F.H.: Acetoacetate Decarboxylase. Identification of Lysine at the Active Site. Biochemistry 5 (1966) 817-823.
- WEBER, K., OSBORN, M.: The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406-4412.

- WEILER, E.: Die radioimmunologische Bestimmung von Digoxin und verwandten Verbindungen in Digitalis lanata EHRH.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1977
- WENKERT, E.: Biosynthesis of Indole Alkaloids.
The Aspidosperma and Iboga Bases.
J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 98-102.
- WILLIAMS, D.E., REISFELD, R.A.: Disc Electrophoresis in Polyacrylamide Gels. Extension to New Conditions of pH and Buffer.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 373-381.
- WILSON MILES, E.: Modification of Histidyl Residues in Proteins by Diethylpyrocarbonate. In: Methods in Enzymology Vol. XLVII. Enzyme Structure Part E. Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N. (eds.) Academic Press New York, San Francisco, London 1977
- WILSON, M.B., NAKANE, P.K.: Recent Developments in the Periodate Method of Conjugating Horseradish Peroxidase (HRPO) to Antibodies. In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (eds.) Elsevier/North-Holland Amsterdam, New York 1978
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.: Antraquinone Production by Cell Suspension Cultures of Morinda citrifolia.
Planta medica Suppl. (1975) 79-101.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application, Proceedings in Life Science. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.) Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1977
- ZENK, M.H.: Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids.
J. Nat. Products 43 (1980) 438-451.
- ZENK, M.H.: Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung. Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin. Vortrag vor der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, 112. Versammlung, Mannheim 1982

D a n k s a g u n g

Herrn Prof. Dr. M.H.Zenk danke ich für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas. Besonders seine Anteilnahme und Unterstützung haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. G.Snatzke, Bochum, für die Messung von CD-Spektren, Herrn Dr. G.Höfle, Braunschweig, für die Registrierung von ^1H -NMR-Spektren und Herrn Dr. J.Stöckigt für die Aufnahme von Massenspektren sowie seine Hilfe bei der Interpretation aller spektroskopischen Daten.

Dem Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, gilt der Dank für finanzielle Unterstützung. Empfänger dieser Finanzmittel war Prof. Dr. M.H.Zenk.

L e b e n s l a u f

Am 27. September 1955 wurde ich, Ursula Pfitzner, geb. Seipel, als erstes Kind der Eheleute Heinz Seipel und Margret Seipel, geb. Hagemann in Bochum geboren.

Ab April 1962 besuchte ich die Volksschule An Der Wiemelhauser Straße. Im Frühjahr 1966 wechselte ich zur Lessing-Schule in Bochum-Langendreer über und legte dort im Juni 1974 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum auf, welches ich im Oktober 1979 mit der Diplom-Hauptprüfung abschloß. Seitdem war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M.H.Zenk beschäftigt.

In der Zeit von Oktober 1979 bis März 1980 hatte ich eine Stelle als Studentische Hilfskraft und seit April 1980 als teilzeitbeschäftigte Wissenschaftliche Hilfskraft inne.

